



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Veterinária
Graduação

Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol) Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para Tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte.

Yvonaldo Wlademir Saldanha Bizarro

Brasília – 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Veterinária
Graduação

Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol), Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para Tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte.

Autor: Yvonaldo Wlademir Saldanha Bizarro

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro

Monografia apresentada a Faculdade de Agronomia e Veterinária - FAV, da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial à obtenção do grau de Graduado em Medicina Veterinária.

Brasília – 2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada à fonte.

Bizarro, Yvonaldo Wlademir Saldanha
Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol), Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para Tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte./ Yvonaldo Wlademir Saldanha Bizarro – Brasília, 2011.
Monografia (Graduação) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina e Veterinária, Laboratório de Anatomia Veterinária, 2011.
Programa de graduação: Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Produção animal
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro
1. anestésicos. 2. Eugenol. 3. Benzocaína. 4. Sal. 5. Tilápia
I. Título

AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor : BIZARRO, Yvonaldo Wlademir Saldanha

Título: Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol), Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para Tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte.

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília para obtenção do Título de Graduado.

Data: 05/ 07 / 2011.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Aline Mondini Calil Racanicci

Instituição: UnB

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Nince Ferreira

Instituição: UnB

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro

Instituição: UnB

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa Urânia , ao meu filho Vinicius Miguel , aos meus pais Sérgio e Ivone e ao meu irmão Danilo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Diana Navarro , pelo empenho , incentivo e pelas horas dedicadas a mim e a este trabalho demonstrando toda a paciência e zelo dos grandes mestres e por ser um grande incentivador desta fascinante área que é a piscicultura.

A todos professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB pela dedicação ao ensino e pela transmissão de conhecimento que transcendem os restritos limites da informação técnica.

A todos funcionários e corpo técnico do centro de tecnologia em piscicultura da Granja Ipê, SEAPA DF, por fornecer acesso às instalações , pelo inestimável auxílio na realização do experimento , pela solicitude e incentivo, os meus agradecimentos em especial aos seus responsáveis técnicos Lincoln Nunes Oliveira e Ângelo Augusto Procópio Costa.

A todos os colegas e amigos que ajudaram e participaram na execução deste trabalho , em especial a Samantha Campos de Sousa.

Aos colegas de curso e amigos pela amizade , suporte e companheirismo ao longo destes anos de convívio.

E acima de tudo aos meus amados familiares por todo o suporte , paciência e incentivo.

"Assim como o caos tumultuado de uma tempestade traz uma chuva nutritiva que permite à vida florir, assim também nas coisas humanas tempos de progresso são precedidos por tempos de desordem. O sucesso vem para aqueles que conseguem sobreviver à crise."

I Ching No. 3

RESUMO

BIZARRO, Y.W.S. **Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol), Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para tilápia do Nilo submetidos à simulação de transporte.** [Association of anesthetic clove Oil (Eugenol), Benzocaine and Sodium Chloride in different concentrations on Nile tilapia subjected to simulated transportation.] 2011. Monografia – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Este trabalho tem como o objetivo a avaliação clínica do uso, efeitos, eficiência e viabilidade de diversas substâncias sedativas e anestésicas usadas para transporte de peixes com o objetivo de diminuir os efeitos do estresse de manejo e manipulação em especial da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a tratamento com diversas concentrações de óleo de cravo (3,0ml/L ; 6,0ml/L), Benzocaína (20 mg/L; 40 mg/L), Cloreto de sódio (5g./L ; 10g./L) e conjugação de Óleo-de-cravo mais Cloreto de sódio (3,0ml.L + 5g./L ; 6ml./L + 10g./L) simulando as condições usuais de manipulação e transporte na piscicultura comercial. De acordo com os dados encontrados, concluiu-se que o Cloreto de Sódio e o óleo de cravo são melhores alternativas em comparação a segurança e facilidade operacional, custo e facilidade de obtenção no comércio, entretanto a Benzocaína apresentou melhores tempos de indução e retorno anestésicos em comparação com as outras substâncias empregadas em situação de transporte.

Palavras-chaves: anestésicos, Eugenol, Benzocaína, Sal, Tilápia.

ABSTRACT

BIZARRO, Y.W.S. **Association of anesthetic clove Oil (Eugenol), Benzocaine and Sodium Chloride in different concentrations of Nile tilapia subjected to simulated transportation** [Associação do anestésico Óleo-de-cravo (Eugenol), Benzocaína e Cloreto de sódio em diferentes concentrações para Tilápias do Nilo submetidos à simulação de transporte.]. 2011. Monografia – Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

This work has as objective clinical assessment of the use, effects, efficiency and feasibility of various anesthetic and sedative substances used for transporting fish in order to reduce the effects of stress management and handling of special-the-Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with different concentrations of clove oil (3.0 ml / L, 6.0 ml / L), Benzocaine (20 mg / L, 40 mg / L), sodium chloride (5g. / L, 10g. / L) and combination of clove oil-for-sodium chloride (3.0 ml. 5g. / L; 6ml. / L + 10g. / L) simulating the usual conditions of handling and transportation in commercial fish farming. according to our data, we concluded that the sodium chloride and clove oil are better alternatives compared the safety and operational ease, cost and ease of getting in the trade, though the best times benzocaine showed induction of anesthesia and return compared to other substances used in transport situation.

Key words: anesthetics, Eugenol, Benzocaine, Salt, Tilapia.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema de ação do Cloreto de Sódio no organismo dos peixes.....Pg. 20
- FIGURA 2 - Foto de exemplar de Tilápia variedade GIFT.....Pg. 24
- FIGURA 3 – Imersão de alevinos em sacos de transporte.....Pg. 27
- FIGURA 4 – Sacos de transporte dispostos em baldes para devida separação de tratamentos e preparo para transporte.....Pg. 27
- FIGURA 5 – Sedação e posterior pesagem amostral em balança de precisãoPg. 28
- FIGURA 6 – Soluções usadas nos tratamentos : Cloreto de Sódio(sal) , Eugenol(óleo de cravo) e Benzocaína.....Pg. 29
- FIGURA 7 – Sacos de transporte com alevinos imersos em soluções diversas dispostos ao chão.....Pg. 30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estágios de anestesia de acordo com o comportamento dos peixes.....Pg.17

TABELA 2 – Estágio de retorno anestésico pela resposta comportamental dos peixes.....Pg. 31

TABELA 3 - Médias obtidas dos tratamentos iniciais e finais de temperatura , oxigênio dissolvido e pH.....Pg. 33

TABELA 4 – médias dos tempos obtidos sobre tempo de indução e tempo de retorno anestésicos nos diversos tratamentos e contagem de sobrevivência imediata , após 24 horas e 48 horas após tratamentos.....Pg. 34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. O impacto do estresse e o transporte de peixes.....	14
2. 2. O transporte	15
2.3. Anestésicos e sedativos.....	16
2.3.1. Eugenol (óleo-de-cravo).....	18
2.3.2.Cloreto de sódio (Sal)	19
2.3.3. Benzocaína	21
2.4. A espécie : Tilápia.....	22
2.5. Parâmetros da água	24
3. OBJETIVO	26
3.1. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Local do experimento	26
4.2. Animais	26
4.3. Preparo das soluções anestésicas.....	28
4.4. Coleta de dados	29
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	32
5.1. Comportamento dos peixes	32
5.2. Tempo de indução , Tempo de retorno e Sobrevivência	33
6. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Práticas rotineiras e necessárias da piscicultura, como biometria, análise patológica, implante hormonal e particularmente o transporte, ou seja, todos procedimentos que envolvem a manipulação direta dos animais e que são predisponentes de problemas e frequentemente expõem os peixes a uma variedade de fatores estressantes que têm o potencial de afetar seu desempenho e sanidade (GOMES,2001). A importância do conhecimento e execução de métodos que permitam tais atividades com o mínimo de interferência nas funções vitais e fisiológicas dos peixes o que é de primaz importância na redução de problemas e melhora nas condições de bem estar animal, tanto na lida quanto no transporte dos animais.

O estresse de captura experimentado pelos animais repercute diretamente na sanidade animal na medida em que traumas, perdas de escamas, formação de feridas e morte podem ser comuns imediatamente ao ato de captura e transporte da espécie piscícola a ser transportada. Há ainda tardiamente problemas relacionados com a diminuição ou retirada de fatores de proteção como o muco cutâneo e perda de escamas pela abrasão provocada pela agitação e/ou manipulação dos animais tanto quanto pela diminuição drástica do fator responsivo do sistema imune desencadeado pelos hormônios do estresse, portanto os anestésicos entram como importante instrumento de auxílio na piscicultura na execução de tais técnicas de forma o menos traumática possível, reduzindo significativamente as perdas e melhorando significativamente o bem estar animal.

Substâncias anestésicas são frequentemente utilizadas para reduzir a hipermotilidade e hiper-responsabilidade ,facilitando o trabalho com os animais, além de reduzir o estresse causado pela manipulação dos peixes (INOUE *et al.*, 2003). Portanto o uso de anestésicos auxilia na diminuição do estresse, à medida que reduzem a atividade e o metabolismo dos peixes, reduzindo injúrias físicas, consumo de oxigênio, excreção de metabólicos tóxicos e grande economia de oxigênio(OLIVEIRA,1999).

No processo de produção e/ou o transporte de peixes os mesmos são afetados por uma série de agentes ou fatores estressantes, como captura, superpopulação, mudanças bruscas de temperatura, manuseio, barulho excessivo e o próprio transporte, gerando significativas perdas em produtividade e qualidade do produto final proveniente do pescado. O sucesso do transporte consiste em conter a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, deterioração da qualidade da água e estresse dos animais, daí a importância no uso de anestésicos que minorem estes efeitos nocivos da manipulação dos peixes (MOYLE & CECH, 1988 ;GROTTUM *et al.* 1997 ; ROSS, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O impacto do estresse e o transporte de peixes

De acordo com WENDEELAR-BONGA (1997), o estresse pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou perturbado pela ação de estímulos denominados estressores. A ação dos estressores é dupla: eles produzem efeitos que ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático e também provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa (Síndrome adaptativa). Uma vez o animal submetido ao estresse contínuo e constante, a resposta fisiológica dá lugar a disfunção podendo acarretar danos permanentes à sua saúde e bem-estar animal (CARMICHAEL, 1984). Portanto técnica e condições adequadas assim como tempo máximo para o transporte devem ser observadas visando diminuir os efeitos nocivos do transporte na produção.

O peixe reage de forma que o estresse resultante da captura segue fisiologicamente com o desencadeamento da Síndrome de Adaptação Geral (SAG), dividida em três respostas: primária, secundária e terciária (CARMICHAEL *et al.*, 1984; MOYLE & CECH, 1998; STAURNES *et al.*, 1994). A resposta primária (neuroendócrina), é caracterizada por um significativo aumento de cortisol e da concentração de adrenalina e noradrenalina, que estimulam a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, por consequência aumentando os níveis de glicose no sangue, com diminuição da proteína muscular e aumento do batimento cardíaco resumindo a resposta imediata ao estímulo agressor (reação de “fuga e/ou luta”) e marcando o início da resposta secundária. A partir desta, são notadas clinicamente as alterações clínicas no animal, onde os corticosteroides estimulam um aumento da permeabilidade da membrana celular. Posteriormente a resposta terciária é marcada pela diminuição da resistência dos peixes às doenças, devido a ocorrência de uma linfocitopenia (diminuição do número de linfócitos) e neutrofilia (aumento do número de neutrófilos circulantes) de acordo com (MAZEUAUD *et al.*, 1977).

Os distúrbios osmorregulatórios induzidos pelo estresse tem por consequência a alteração do balanço hídrico e mineral. Conseqüentemente afetando o peso e a qualidade do produto proveniente do peixe, ocorrendo perda de peso em espécies marinhas e ganho de peso (não em massa) em peixes de água doce (KIRK, 1974). A perda ou ganho de água esta relacionada com a taxa de “embebição” ou “diurese”, catalisadas pela ação da adrenalina nas funções branquiais, resultando em um aumento na permeabilidade da membrana, pois o estresse afeta o balanço de sódio nos peixes, onde em situações de estresse catalisadas pela manipulação como é o caso do transporte, há severas perdas de sódio através das brânquias (RANDALL *et al.*, 1972; MAZEUAUD, 1977).

O eixo hipotalâmico-pituitária-inter-renal (HPI) é estimulado em resposta ao estresse PICKERING(1993), resultando em inibição da liberação do hormônio do crescimento (GH) por supressão glandular (HEW, 1989).O hormônio do crescimento (GH) aumenta o apetite e a eficiência na conversão do alimento o que é impactante na produção se um transporte mal executado onde medidas mitigadoras de estresse e seus efeitos fisiológicos não sejam levadas em consideração , há significativas perdas tanto nas fases iniciais quanto nas fases tardias da produção .Outro efeito impactante do estresse na produção é a redução de taxa de fertilidade pela diminuição nos níveis de testosterona nos peixes,PICKERING (1993) e em fêmeas, o cortisol atua no fígado, reduzindo o número de receptores hepáticos para o estradiol como consequência a redução no desenvolvimento gonadal , este ultimo efeito tem particular importância no transporte de matrizes e reprodutores.

Diversas pesquisas mostram que a capacidade do estresse em inibir o desempenho reprodutivo de peixes, quando expostos a situações de estresse os seus processos reprodutivos são alterados devido à depressão funcional da glândula pituitária e redução de níveis plasmáticos de gonadotropinas , CARRAGHER *et al.*(1989),até o decréscimo dos níveis de hormônios esteroides , PICKERING *et al.*(1987) , redução do tamanho dos ovos e da qualidade das larvas ,CAMPBELL *et al.*(1992, 1994) afetando sobremaneira a viabilidade dos mesmos até o ponto da completa paralisação da maturação das gônadas , como é o caso das Tilápias.

2. 2. O transporte

Segundo GROTTUM *et al.*(1997) , o principal fator de sucesso do transporte é conter a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade , deterioração da qualidade da água (temperatura , concentração de oxigênio e constituição iônica) e estresse.O transporte é etapa crucial no processo produtivo, a sua boa execução esta relacionada na observância criteriosa dos elementos envolvidos nesta técnica tanto operacionais quanto relativo aos materiais cuidados com os parâmetros da água , tipo de material ou embalagem para transporte, idade e número de animais a ser transportado , espécie , possibilidade de oxigenação e uso de substancias anti estresse e profiláticos .Isso repercute diretamente na eficácia e sucesso da etapa da produção que corresponde a venda de produtos não acabados ou para reprodução , portanto o transporte é um manejo inevitável no processo produtivo, mesmo que seja um procedimento que gera intenso estresse e que expõe os peixes a uma série de estímulos que desencadeiam respostas fisiológicas adaptativas , muitas vezes patológicas , a estes estímulos, (IVERSEN *et al.*, 1998; URBINATTI & CARNEIRO, 2004; ADAMANTE,2005).

Segundo PEDRAZINNE *et al.* (2007), os fatores críticos a se considerar em relação ao transporte estão relacionados com a captura, a espera pelo transporte ou o tempo de deslocamento, o tipo de embalagem dos peixes e o controle dos fatores ambientais da água antes, durante e após o transporte. O transporte gera um conjunto de agentes estressores aos organismos aquáticos que podem causar injúrias aos animais, tais como: manipulação direta, vigorosa atividade muscular (o que pode diminuir o oxigênio das células), exposição à água de baixa qualidade durante o transporte e a movimentação constante das embalagens (Barton, 2000).

Segundo INOUE *et al.* (2003), em análise de transporte de matrinxãs (*Brycon cephalus*) os autores observaram uma excessiva perda de muco, escamas e agressões entre os peixes durante o mesmo. ABREU *et al.* (2008) estudando respostas de estresse de juvenis de matrinxã após transporte, em sistema fechado sob diferentes densidades de cargas observaram que o cortisol plasmático e a glicose sanguínea aumentaram após o transporte nos peixes em todas as densidades estudadas.

2.3. Anestésicos e sedativos

Uma vez estabelecida a necessidade de controle ou ao menos a mitigação dos efeitos do estresse no organismo dos peixes, os anestésicos e sedativos são uma boa alternativa. Para cada anestésico existe uma concentração diferente de acordo com o estágio de sedação a ser alcançado, que vai desde uma sedação leve até uma sedação profunda. A escolha de um anestésico está relacionada com o preço, disponibilidade no mercado, eficiência, finalidade de uso e o destino do animal após a aplicação da droga (MELLO, 2010).

A escolha do anestésico deve nortear-se pelos seguintes princípios: 1- Ter ação reversível; 2- Não deve ser irritantes aos tecidos; 3- Deve ter seu início de ação rápido e ter duração suficiente a técnica adotada; 4- Deve apresentar grau reduzido de toxicidade; 5- Deve apresentar potencial suficiente para anestésias; 6- Deve apresentar biocompatibilidade e boas propriedades de penetração aos sítios de ação; 7- Não deve desencadear reações alérgicas; 8- Deve ser estável em soluções e sofrer biotransformação rápida no organismo e 9- Estar estéril ou capaz de ser esterilizado sem deterioração (ROSS & ROSS, 2009).

Além do custo, durante a escolha do medicamento a ser utilizado para fins anestésicos, além do custo deve-se ter em mente os cuidados básicos de manipulação e descarte, mesmo não existindo uma lei reguladora específica no uso de anestésicos para peixes no Brasil. No entanto o conhecimento da substância a ser empregada e suas possíveis implicações na saúde do peixe e

do operador , efeitos adversos e residuais devem ser de pleno conhecimento e seus reflexos no seu eventual consumo de produtos oriundos de pescado , além disso o correto destino dos resíduos produzidos e sua redução de possíveis impactos no meio ambiente devem ser seguidos , obedecidos estes critérios segue-se na execução da técnica anestésica onde os peixes selecionados deverão ser tratados em recinto apropriado .

Quando imersos na água com anestésico, os peixes passam por uma sequência de estágios de anestesia. Os estágios da anestesia estão associados a mudanças comportamentais visíveis(Tabela 1), iniciando-se com a redução do movimento opercular até a completa perda de reação à manipulação, sendo elas dividida em quatro etapas. O primeiro estágio inicia-se segundos após o animal entrar em contato com o anestésico, quando ocorre a diminuição do movimento opercular, passando-se para o início de perda de equilíbrio, seguido da perda total de equilíbrio até chegar ao quarto estágio, em que ocorre a perda total de reação a qualquer estímulo. O estágio normalmente utilizado para a biometria, manuseio de peixes e reprodutores é a anestesia profunda, no qual o peixe perde totalmente o equilíbrio, sendo o tempo ideal para atingir este estágio entre um e três minutos (ROUBACH & GOMES, 2001).

Tabela 1- Estágio de anestesia em relação ao comportamento

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.

segundo ROUBACH & GOMES (2001)

A anestesia gera uma perda de sensibilidade ou uma sedação (estágio preliminar da anestesia), induz sonolência e reduz a sensibilidade sensorial com efeito analgésico sendo de caráter reversível, de acordo com a dosagem e fármaco empregado além da correta técnica de administração. Os

anestésicos agem a nível axonal, atuando ativamente e /ou bloqueando os receptores nervosos específicos de acordo com o tipo de anestésico empregado e a via de administração adotada. As vias anestésicas possíveis para efetuar a anestesia podem ser feitas por compostos administrados via inalatória (diluído na água), via parenteral, via oral e via intramuscular. Para qualquer método ou princípio anestésico utilizado deve-se ter o controle dos fatores que podem interferir na eficiência anestésica tais como: temperatura ambiente e da água, fatores biológicos relacionados com a espécie do peixe , pH das soluções anestésicas , níveis de amônia na água , dureza da água e ausência ou presença de alimento no tubo digestivo dos animais .

Trabalhos com uso de anestesia em peixes para transporte ainda exigem mais dados de pesquisa em função da diversidade de espécies existentes e pela necessidade crescente de tecnologias adequadas de produção obedecendo critérios éticos e de bem estar aos animais produzidos e para obtenção de produtos seguros , saudáveis e ambientalmente adequados. Particularmente para as espécies nativas brasileiras tais informações serviriam como forma de redução na pressão predatória e melhora nos índices produtivos .

2.3.1. Eugenol (óleo-de-cravo)

O óleo de cravo é uma substância fenólica obtida da destilação das folhas, caules e flores do cravo -da- índia - *Syzygium aromaticum* , (MAZZAFERA,2003). Eugenol é o principal componente (70 a 95%)do óleo de cravo. Tem como princípio ativo o (4-ailil-2-metoxifenol), considerado seguro para humanos, animais e ambiente. É utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e como agente analgésico, antibacteriano, antifúngico , de baixo custo , facilidade de manejo e é amparado por uma diversidade de trabalhos que atestam a segurança no uso do Eugenol para anestesia de peixes de forma segura e eficaz em diversas concentrações TAYLOR & ROBERTS(1999) e possui boa capacidade em reduzir repostas metabólicas ao estresse (SMALL, 2003). Além disso, seu desempenho é melhor que de outras substâncias já utilizadas (WAGNER *et al.*, 2003) .

Sua ação anestésica dá-se , como anestésico típico , pelas seguintes ações bioquímicas que podem ser tanto a nível axônio até medular :1- Age primeiramente na camada externa biomolecular de lipoproteína do nervo ; 2- Reduz a permeabilidade da membrana do nervo ao sódio ; 3- Estabiliza a membrana do nervo em estado polarizado, bloqueia a não despolarização, bloqueando a condução nervosa; 4-Sua ação de bloqueio da condução nervosa é reversível e não produz dano ao nervo.

O Eugenol não demonstra efeitos deletérios aparentes no peixe após a sua utilização, SOTO & BURHANUDDIN(1995); VIDAL *et al.*(2006) apresenta rápida excreção, dispensando período de carência para abate KILDEA *et al.*(2004). De acordo com WAGNER *et al.*(2002), o Eugenol é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência. DERIGGI *et al.*(2006) avaliam as respostas metabólicas da Tilápia do Nilo(*Oreochromis niloticus*) submetidos ao uso de Eugenol, concluíram que é um produto seguro para uso na espécie.

O Eugenol pode ainda ser aplicado com sucesso por aspersão em espécies com respiração aérea, onde a diluição em água ou imersão é pouco eficaz para realização da técnica anestésica, este é o caso do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em que a aspersão direta do fármaco nas brânquias é a opção mais adequada com bons resultados obtidos em trabalhos feitos por HONKZARIC & INOUE (2009), demonstraram que o Eugenol é viável para a espécie, não sendo observada mortalidade, mesmo um mês após os testes.

2.3.2. Cloreto de sódio (Sal)

Embora o Cloreto de sódio (NaCl) não seja uma substância anestésica, este é um importante meio mitigador dos efeitos do estresse nos peixes de água doce, uma vez que tende a 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, auxilia o controle de alguns parasitos ao longo dos transportes, estimula a excreção ativa da amônia através da troca do íon amônio, no sangue dos peixes, pelos íons sódios presente na água (BARTON & ZITZOW, 1995; CARNEIRO & URBINATI, 2001; WURTS, 2003).

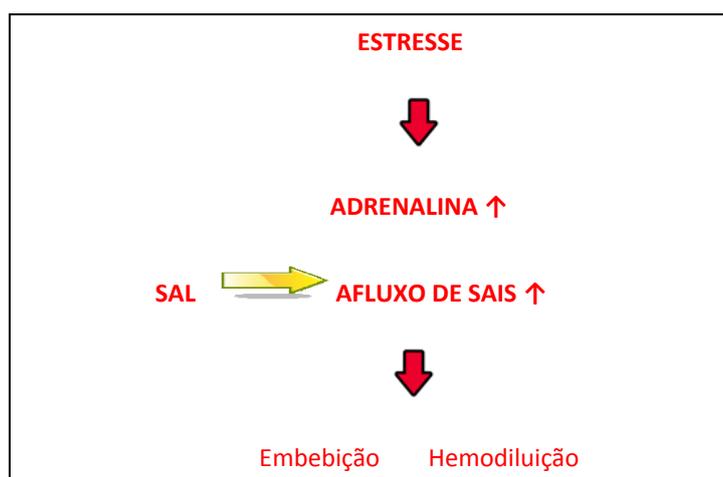


figura 1 - Atuação do cloreto de sódio na fisiologia dos peixes de água doce

A concentração de sais no sangue de peixes adaptados à água doce é 100 vezes mais alta que a encontrada na água, a constante entrada de água e

perda de íons como sódio (Na⁺), cloreto (Cl⁻) e cálcio (Ca⁺⁺) (figura 1) são compensados pela excreção de grandes volumes de urina diluída e captação dos íons perdidos por mecanismo ativo das células de cloreto, (WENDELAAR & BONGA, 1998; Evans et al., 2005). A disfunção osmótica é o principal distúrbio gerado pelo estresse (WENDELAAR & BONGA, 1997). Tal disfunção, gerada pela ação da adrenalina nas células do epitélio branquial que tem como consequência a perda de capacidade de regular o fluxo de íons, havendo um afluxo dos mesmos, obrigando os peixes a desviar energia para manter a homeostase (BARTON & IWAMA, 1991).

O sal também estimula a secreção de muco sobre o epitélio branquial, dificultando a passagem de íons através das membranas celulares e proporcionando uma barreira contra patógenos WURTS (1995), a sua ação dá-se pela redução do gradiente osmótico entre água e corpo do peixe, reduzindo o afluxo de sais, principalmente o sódio e influxo de água e outras substâncias nocivas como a amônia e nitritos. (Brown, 2000). O meio iso-osmótico ao qual o sal tende a fornecer, proporciona menor custo osmorregulatório, disponibilizando mais energia para o animal combater os agentes patogênicos, além de aumentar a produção de muco, o que é endossado pelos estudos de CARNEIRO & URBINATI (2001) onde em concentrações maiores de sal (acima de 6mg/L) há supressão de liberação de cortisol após quatro horas de transporte de matrinxã (*Brycon cephalus*) em uma densidade de 150 kg/m³, possivelmente devido a um ajuste de gradiente entre o peixe e o ambiente, proporcionado pelo cloreto de sódio diminuindo a pressão osmótica e o trabalho osmorregulatório.

2.3.3. Benzocaína

É uma substância anestésica do grupo químico éster e em sua forma original é cristalina e branca (Ethyl 4-aminobenzoato), quimicamente similar ao MS222, COYLE et al. (2004; ROSS e ROSS, 2009) usada geralmente pelo método de imersão, MEINERTZ (1999) tem seu efeito indutor ocorrendo entre dois a quatro minutos e o seu efeito farmacológico provoca redução da ventilação nas brânquias devido a depressão dos centros medulares respiratórios, tendo a hipóxia como possível consequência, DELBON (2006), é pouco solúvel em água, sendo solúvel em álcool ou cetonas, em concentrações médias de sal anestésico a 100g/L, necessitando portanto de soluções precursoras de Benzocaína e diluente, COYLE et al. (2004); ROSS & ROSS (2009) que devem ser armazenadas em vidros opacos ou âmbares podendo desta forma ficar viáveis por longos períodos.

Sua atuação farmacocinética dá-se inicialmente após 30s de exposição gerando uma taquicardia devido a esta rápida absorção, tendendo a uma bradicardia prolongada subsequente, devido a uma rápida ação junto do sistema nervoso central autônomo, gerando um reflexo vagal. Produz

vasoconstrição nas guelras , alterando a taxa de perfusão dos gases .Sua excreção dá-se principalmente pela urina , e em parte menos expressiva pelas guelras , o que pode ocorrer em até uma hora dependendo da espécie e da concentração utilizada , e o composto eliminado é formado pela hidrólise formando o ácido para-amino-benzoico (PABA) ou ainda o Acetil-PABA.(BROWN , 2000).

Por ser um anestésico lipossolúvel, o tempo de recuperação à anestesia pode ser prolongado em animais mais velhos ou em fêmeas gestacionais que apresentam um conteúdo de tecido adiposo mais acentuado., ou ainda submetidos a longa exposição (ROSS & ROSS, 2008).

O Brasil não apresenta norma específica sobre o medicamento , mas seguindo norma da agência regulatória norte americano , FDA (Food and Drug Administration) aconselha-se o consumo dos produtos de pescado submetidos ao tratamento com Benzocaína após o prazo de 21 dias,ROSS & ROSS (2009) o que significa um período de carência o que pode gerar prejuízo se o uso for em animais próximos de abate.

Quanto a possibilidade de resíduos segundo ROSS & ROSS (1999), são necessários 21 dias de carência para a comercialização e consumo dos peixes tratados com compostos a base de Benzocaína .Segundo ALLEN (1988), imediatamente após o uso de de Benzocaína em largemouth bass e truta arco-íris encontrou-se resíduos na quantidade de 10,65 e 14,01 µg/g, respectivamente da substância anestésica e que não foram removidos dos tecidos durante o tempo de duração do experimento. Vários estudos relatam a eficácia da Benzocaína como um anestésico em diferentes espécies de peixes, como os estudos em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* ,GOMES et al.(2001), em juvenis de matrinxã, *Brycon caphalus* ,INOUE et al.(2004), em Juvenis de tilápia ,*Oreochromis niloticus* DELBON(2006); lambari do rabo amarelo, *Astyanax altiparanae* ,GIMBO et al.(2008); juvenis do pampo, *Trachinotus marginatus*,(OKAMOTO et al., 2009).A Benzocaína tem sido utilizada como tranquilizante, para obtenção de analgesia ou anestesia de peixes de várias espécies, tendo sido observada margem de segurança muito pequena entre a dose eficaz e a dose letal (OLFERT & CROSS,1993).

2.4. A espécie : Tilápia

Peixes de escamas apresentando corpo um pouco alto e comprimido , apresenta cerca de 70 espécies de Tilápia, distribuídas em três gêneros, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilápia*, são pertencentes à família *Cichlidae*, cuja maioria é originária de rios africanos, e está apta a viver e reproduzir em ambiente com alta salinidade(HILSDORF,1995). É a espécie mais cultivada no

Brasil e está entre as mais importantes na piscicultura mundial , sendo a segunda em produção(FAO,2007).

Inicialmente foi introduzida no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DENOCS), no estado do Ceará em 1971 ,CASTAGNOLLI (1992), introduziu-se inicialmente as seguintes espécies: *Oreocromis niloticus* (tilápia do Nilo) que pode alcançar cerca de 5kg; *Tilapia rendali* (tilápia rendali) com cerca de 1kg; *Sarotherodon hornorum* (tilápia zanzibar) de coloração escura e maxilas protráteis; e uma variedade desenvolvida em Israel a "Saint-Peters".

Atualmente faz-se a criação comercial com uso de híbridos entre estas espécies formadores e suas linhagens , em especial a G.I.F.T.(Genetic Improved Farmed Tilapia), que apresenta bons índices zootécnicos e alta adaptação ao tipo de piscicultura executada na maior parte do Brasil ,esta linhagem é um dos principais híbridos criados comercialmente na atualidade no Brasil é resultado de pesquisa que foi iniciada na Malásia, em abril de 1988, sob a liderança de um órgão não-governamental denominado Wordfish Center GUPTA(2004); ACOSTA(2004); LI *et al.*(2006) é composta por quatro linhagens comerciais de Tilápias cultivadas na Ásia e outras quatro linhagens silvestres de cultivo Africano (GUPTA; ACOSTA, 2004). Esta combinação de oito linhagens proporciona uma maior variabilidade genética e consequente maior probabilidade de melhora de caracteres produtivos.

É uma espécie de peixe territorialista, onívoro , com hierarquia de dominância e submissão estabelecida por confrontos entre os indivíduos. São peixes de hábitos lentos, resistentes à enfermidades a fácil aceitação de ração ,e com alta rusticidade(CASTAGNOLLI,1992).São peixes que toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido, inferiores a 1,0 mg/L ,EL-SAYEDALI *et al.*(2003) ; SIMÕES e GOMES(2009), compatíveis com a sobrevivência , porém incompatíveis com a produção , apresenta ainda facilidade de obtenção de larvas ,(FURUYA *et al.*,2004). Apresenta um desempenho zootécnico melhor expresso em temperaturas da água situadas entre 26°C e 28°C ,CASTAGNOLLI (1992), caracterizando-se portanto como espécie de peixe tropical, apresenta ainda uma alta tolerância a salinidade relatado por diversos autores: BALARIN & HATTON (1979); WOHLFARTH & HULATA (1981); CHERVINSKI (1982) o que lhe confere uma alta possibilidade de criação nas mais diversas bacias hidrográficas inclusive com uso de água desalinizada.

Segundo NOGUEIRA (2008), os motivos que justificam a preferência dos produtores pela Tilápia, entre os quais destacam-se:

- Fácil adaptação às diversas condições de cultivo nas diferentes regiões do País;
- Ciclo de engorda relativamente curto (seis meses em média);

- Aceitação de uma ampla variedade de alimentos;
- São resistentes a doenças , altas densidades de povoamento e baixo teor de oxigênio dissolvido;
- Desova durante todo o ano, em condições de temperatura controlada;
- Possui carne saborosa e saudável, com baixo teor de gordura (0,9g por 100g de carne) , portanto bem aceita no mercado;
- Possui baixo nível de calorias (172 kcal por 100g de carne);
- Não possui espinhas em forma de “Y”; o que facilita o processo de obtenção de filés;
- O rendimento do filé chega a 37% em peixes com peso médio de 600 gramas. Peso médio aceito na maior parte dos mercados consumidores.

A Tilápia-do-Nilo , a mais comum em criações comerciais , é uma espécie que apresenta espinhos ósseos nas nadadeiras , em especial as dorsais, os quais são expostos pelo peixe como defesa em situação de captura o que frequentemente provoca ferimentos nos manuseadores e nos demais peixes quando da despescagem por redes e puçás , portanto justificando o uso de anestésicos como importante ferramenta para reduzir o estresse do animal e ferimentos durante o manejo, e a segurança dos manuseadores na manipulação dos animais em pisciculturas (VIDAL *et al.*, 2008).

A espécie de eleição para o experimento a Tilápia do Nilo (*Oreocromis niloticus*) foi escolhida por esta ser a que mais se destaca na piscicultura mundial, por apresentar rusticidade, alto ganho de peso, facilidade de reprodução, excelente sabor da carne e tempo curto para atingir o tamanho comercial (KUBITZA, 2000).



Figura – 2 :Foto de exemplar de Tilápia variedade GIFT

Fonte:Embrapa Tocantins.

2.5. Parâmetros da água

A água de transporte deve atender certas características que possibilitem a sobrevivência dos peixes transportados, deve estar em quantidade compatível com o número de animais a ser transportado, ser limpa livre de substâncias químicas nocivas aos peixes, ter um pH adequado e deve estar em temperatura compatível para o transporte, por exemplo para espécies tropicais, segundo (VIEIRA, 2003). A temperatura tem significativa importância nos processos metabólicos dos peixes, que são animais poiquilotérmicos, onde na sua redução há queda do metabolismo com a consequente redução dos mecanismos fisiológicos de absorção e excreção, influenciando portanto no tempo de indução e no tempo de recuperação anestésicos.

Uma temperatura mais baixa, em torno de 20° C e 30° C reduz o metabolismo dos animais, diminuindo o consumo de oxigênio e a excreção de gás carbônico e amônia e reduz a produção de catabólitos que diminuem a qualidade da água e resultando diminuição de tempo viável de transporte conforme KUBITZA (2003); OSTRENSKY *et al.* (2000); GOMES *et al.* (2001); ROSS & ROSS (1999), porém temperaturas abaixo de 20 ° C podem ocasionar choque térmico, perda de apetite, imobilização ou morte, novamente em espécies tropicais, portanto o cuidado com a temperatura da água é de real importância. Uma alternativa é transportar peixes em caixas isotérmicas para quantidades menores ou espécies mais sensíveis a variações de temperatura ou executar o transporte nas primeiras horas da manhã onde a temperatura esta mais próxima dos limites aceitáveis, na maior parte do território brasileiro, preconizados para peixes tropicais.

A temperatura da água também influencia na farmacocinética de certos anestésicos, Trabalhos utilizando Eugenol na anestesia de peixes comprovam que a temperatura da água tem influência na indução e recuperação do anestésico (Park *et al.*, 2008). Em baixas temperaturas as concentrações de Eugenol precisam ser maiores para a indução da anestesia e mais lenta será sua recuperação. Vários autores demonstram que as concentrações dos anestésicos, em temperaturas mais baixas os tempos de indução e de recuperação são significativamente maiores enquanto que nas temperaturas mais altas o tempo de indução e recuperação são significativamente menores (Hikasa *et al.*, 1986; HOSKONEN & PIRHONEN, 2004; WOOLSEY *et al.*, 2004; MYLONAS *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009).

O pH refere-se ao gradiente de concentração entre ácidos e base dissolvidos na água, reflete o grau de acidez ou de alcalinidade da mesma e varia em uma escala numérica de 0 a 14, onde para peixes a mensuração de valores abaixo de 4 e acima de 11 são letais. Os valores de pH localizados entre 6,5 a 8,0 são mais adequados à produção

de peixes. Valores abaixo ou acima desta faixa podem prejudicar o crescimento e a reprodução em condições extremas, causar a morte dos peixes (KUBITZA, 1999). Em águas ácidas, os íons H^+ em excesso competem com os íons Ca^{2+} e Na^+ da água, inibindo a sua captura pelo peixe, além de afrouxarem as junções proteicas paracelulares da membrana branquial, de modo que aumenta a perda de íons para o meio (BALDISSEROTTO, 2003). Exposição às águas de pH muito alcalino pode causar distúrbios no influxo de Na^+ e Cl^- , causado pela inibição do transporte de íons pelas brânquias (WILKIE *et al.*, 1999). Da mesma forma, a excreção de NH_3 é reduzida e, conseqüentemente, ocorre acúmulo de NH_3 no plasma (WILKIE & WOOD, 1994).

Os valores de oxigênio dissolvido (OD) na água variam entre 0 e 13 mg/L. seus valores devem ser mensurados com critério pois dependendo da espécie a ser transportada, a variação do oxigênio dissolvido pode provocar a morte dos peixes por embolia, devido ao excesso de oxigênio dissolvido ou por simples asfixia, para valores baixos. Ficando a concentração ideal em valores acima de 4 mg/L. Para este parâmetro novamente a temperatura é importante, pois em oscilações de temperaturas há também oscilação na pressão do gás dissolvido com perdas ou manutenção da dissolução do oxigênio em água.

3. OBJETIVO

Objetivou – se avaliar a ação e os efeitos clínicos de substâncias sedativas e anestésicas em simulação de transporte de Tilápia.

3.1. Objetivos específico

- Testar, entre várias concentrações de Eugenol (óleo de cravo), Benzocaína, Cloreto de Sódio(Sal) e associação quais apresentaram melhores tempos de indução e recuperação anestésica e comparar resultados quanto ao uso dos respectivos tratamentos e substâncias utilizadas.
- Avaliar clinicamente a sensibilidade dos peixes anestesiados às concentrações escolhidas.
- Avaliar a taxa de mortalidade imediata, após 24 horas e após 48 horas dos tratamentos realizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido nas instalações do Centro de Tecnologia em Piscicultura da SEAPA, localizada na BR 450, Km 30, Park Way, Brasília-DF.

4.2. Animais

Foram utilizados um total de 1.800 alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade G.I.F.T. (Genetically Improved Farmed Tilapia) provenientes da mesma estação de piscicultura. O lote misto entre machos e fêmeas apresentando idade de 50 dias homogeneamente selecionados com tamanho aproximado médio de 5 cm. de comprimento e 6g. de peso, esta seleção foi executada com auxílio do selecionador de peixes modelo D6002 de marca Bernauer. O delineamento experimental inteiramente casualizado, com 9 tratamentos em três repetições, o tratamento 1: controle, Tratamento 2: Benzocaína 20 mg/L, Tratamento 3: Benzocaína 40 mg/L, tratamento 4: Eugenol 3 ml/L, Tratamento 5: Eugenol 6 ml/L, Tratamento 6: Eugenol 3 ml + 5 gramas de sal, Tratamento 7: Eugenol 6 ml + Sal 10 gramas, Tratamento 8: Sal 5 gramas /L, Tratamento 9: Sal 10 gramas/L. Cada tratamento será composto por 50 peixes.

Exemplares de peixes submetidos a jejum prévio de 24 horas foram acondicionados em sacos plásticos transparentes com capacidade para 20 L contendo 5 L de água e as substâncias em estudo (figura 3 e 4). Cada unidade experimental será constituída de um saco plástico contendo 50 alevinos. Os peixes serão mantidos dentro dos sacos, no laboratório, durante 5 horas, tempo médio utilizado no transporte de alevinos. O grau de interferência dos anestésicos no comportamento dos peixes (Tabela 1) será registrado segundo (ROUBACH & GOMES, 2001); WOODY *et al.*, 2002).



Figura - 3 : Foto Do acondicionamento dos alevinos nos sacos de transporte



figura – 4:Foto da preparação e disposição dos tratamentos

Para a análise biométrica amostral, foram coletados 30 alevinos, os quais foram sedados com uso de solução de 5 ml de solução alcoólica de Benzocaína na concentração de 40mg/L diluídos em 1 litro de água em recipiente plástico inerte em separado onde foram imersos os alevinos selecionados ao acaso, uma vez atingido o estágio de sedação seguiu-se a biometria feita com o auxílio de paquímetro e concomitantemente feita a realização da pesagem em balança de precisão de todos os 30 alevinos de cada tratamento(figura 5).



Figura – 5: Foto da sedação e pesagem dos alevinos

4.3. Preparo das soluções anestésicas

As soluções foram previamente preparadas e/ ou pesadas anteriormente ao experimento, a Benzocaína foi manipulada nas concentrações testadas (20mg/L e 40mg./L) em farmácia de manipulação, o Eugenol foi diluído previamente em álcool 70% tendo como base os estudos de MYLONAS *et al.* (2005), onde os animais foram submetidos ao tratamento com etanol com o intuito de se observar possíveis modificações de comportamento devido ao seu uso como diluente , não existe interação anestésica ou mesmo qualquer tipo de interferência quando do seu uso. O sal foi pesado em balança de precisão na quantidade requerida, e todas as substâncias foram colocadas nos baldes devidamente separados e marcados.(figura 6)



Figura - 6 : Foto das soluções e substancias usadas nos tratamentos

4.4. Coleta de dados

A temperatura, o oxigênio dissolvido e pH da água foram aferidas antes e após o procedimento de simulação de transporte, com auxílio de termômetro calibrado , oxímetro (YSI, USA) e kit comercial (Alfakit, Brasil).

Ao término das devidas aferições os peixes foram acondicionados em grupos de 50 animais em cada um dos sacos plásticos de transporte de peixes e para cada tratamento, incluindo os controles, os sacos foram enrolados, adicionado o oxigênio e amarrados com tiras de borracha e os sacos foram acondicionados de lado ao piso, evitando concentrações nas quinas dos sacos

plásticos , evitando perdas de peixes simulando ao máximo as condições ideais de transporte , dessa forma os animais foram mantidos por um período de 5 horas (figura 7), tempo médio considerado para transporte de alevinos e juvenis e distancia percorrida estimada equivalente a 400 Km., tempo e distância considerados como adaptados as distâncias territoriais brasileiras e o tipo de pisciculturas mais adotadas .



Figura – 7: Foto da disposição dos sacos de transporte com os diversos tratamentos

Durante toda a duração do experimento foi feito o acompanhamento clínico e visual das reações e possíveis alterações dos peixes e cronometragem de tempos de indução e manutenção anestésica quando necessário.

O grau de interferência dos anestésicos no comportamento dos peixes baseou-se na avaliação clínica e nos dados e estudos das tabelas desenvolvidas por (ROUBACH & GOMES ,2001 ; WOODY *et al.*, 2002). Caracterizado pelos seis estágios anestésicos. O estágio 1 que é caracterizado por perda de reação aos estímulos visuais e ao toque; o estágio 2 , 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 uso de anestésicos para transporte espera-se alcançar até o estágio 3 da escala uma vez que as concentrações de anestésicos utilizadas não são próprias para estágios mais profundos de anestesia.Para o experimento a notação dos estágios anestésicos alcançados foi feita a partir do momento em que todos os animais se igualam em reação comportamental.

Após as cinco horas de cada ciclo experimental, realizados em dias distintos, os animais foram dispostos em caixas d'água de 1000 litros preparadas para recepção de peixes com entrada de água limpa com vazão constante de água equivalente a 3L/s. com suplemento de ar injetado no

reservatório. Para simular a soltura em tanques, todos os sacos foram dispostos dentro dos reservatórios ainda fechados até alcance de equilíbrio de temperatura entre água dos sacos de transporte e do reservatório, chegado a este ponto os sacos são abertos e uma vez abertos foram colocadas pequenas quantidades de água do reservatório lentamente em intervalos de 15 min. até que se realizou a soltura completa dos animais dentro da caixa, concomitantemente a etapa de aclimação e soltura foi cronometrado o tempo de retorno anestésico até a normalização das reações dos peixes com base nos dados da tabela de retorno anestésico (Tabela 2), para tal feita foi utilizado como base a tabela de retorno anestésico baseada nos estudos de (HIKASA *et.al.*, 1986). A notação deste dado iniciou-se a partir do estágio II, uma vez que não houve aprofundamento anestésico, até o estágio V observado em todos os animais dos tratamentos testados.

Tabela 2 - Retorno anestésico em relação ao comportamento

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

*Modificado de Hikasa *et al.* (1986).

Ao longo de todo o experimento foi feita uma avaliação visual dos animais testados, para notação de alguma possível alteração visível, extraordinariamente notado apenas com os peixes tratados com soluções a

base de Eugenol (óleo de cravo) onde a coloração dos mesmos mostrou-se mais escura e acentuada nos peixes tratados com este tipo de tratamento o que não foi observado nos peixes submetidos aos outros tratamentos. Foi ainda feita avaliação e acompanhamento subsequente dos animais, que foram mantidos em separado em caixas d'água, 24 e 48 horas após cada experimento para verificação de mortalidade, todos mantidos sob condição normal de arraçoamento e oxigenação constantes.

Os dados obtidos nas análises deste experimento foram submetidos a aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias dos tratamentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos foram os seguintes: $21,74 \pm 0,43^\circ\text{C}$ para temperatura inicial, $21,33 \pm 0,03^\circ\text{C}$ para temperatura final, 5,5 para pH; $6,64 \pm 0,36 \text{ mg.L}^{-1}$ para oxigênio dissolvido inicial e $5,90 \pm 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para oxigênio dissolvido final (Tabela 3). A temperatura mensurada e o pH no experimento foi abaixo dos valores preconizados como ideais para Tilápia (KUBITZA, 2000). A concentração de oxigênio dissolvido oscilou entre os valores de 6,3 a 7,0 mg/L estando dentro dos padrões adequados para a espécie de acordo com os estudos que descrevem a concentração de oxigênio dissolvido ideal para Tilápias acima de 4mg/L (BOYDE, 1996). No experimento, a temperatura foi a mesma para todas as concentrações testadas, sem grandes alterações ao longo dos dias do experimento, onde foi verificada uma média de 21°C , temperatura baixa para a espécie, contudo temperaturas mais baixas são adequadas para o transporte na medida que diminuem o metabolismo dos peixes, reduzindo a produção de excretas e diminuição de necessidade de oxigênio propiciando assim maior tempo de transporte (KUBITZA, 2000).

5.1. Comportamento do peixes

Durante o início do experimento foi observado que os animais submetidos ao anestésico Eugenol (óleo de cravo) obtiveram coloração mais escura em comparação a outros tratamentos, esse resultado está de acordo com GRUSH *et al.* (2004); VIDAL *et al.* (2006) que descreveram reação de irritação evidenciada pela hiperatividade ao primeiro contato do peixe com uso de óleo de cravo. O mesmo comportamento de hiperatividade foi observado em juvenis de piavuçu, *Leporinus macrocephalus*, ($1,77 \pm 0,69 \text{ g}$) ao serem submetidos a óleo de cravo (VIDAL *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Médias de temperatura , oxigênio dissolvido e pH inicial e final dos tratamentos testados

TRATAMENTO	TI (°C)	TF (°C)	ODI (MG/L)	ODF (MG/L)	PHI	PHF
Benzocaína 20ml/L	21,76 ^a	21,33a	6,56a	6,03a	5,50a	5,50a
Benzocaína 40ml/L	21,73 ^a	21,33a	6,56a	6,00a	5,50a	5,50a
Eugenol 3mg/L	21,83 ^a	21,03a	6,56a	6,00a	5,50a	5,50a
Eugenol 6mg/L	22,03 ^a	21,36a	6,56a	6,00a	5,50a	5,50a
Eugenol + Sal 3mg/L +5g	22,06a	21,36a	6,36a	5,93a	5,50a	5,50a
Eugenol + Sal 6mg/L +10g	21,50 ^a	21,33a	7,00a	6,00a	5,50a	5,50a
Sal 5g.	21,83 ^a	21,33a	6,90a	6,00a	5,50a	5,50a
Sal 10g.	21,20 ^a	21,33a	6,63a	6,00a	5,50a	5,50a
Controle	21,83 ^a	21,33a	6,63a	6,00a	5,50a	5,50a

TI- temperatura inicial; TF – Temperatura final; ODI – Oxigênio dissolvido inicial; ODF – Oxigênio dissolvido final; PHI – pH inicial; PHF – pH final.Obs.- valores com a mesma letra indicam inexistência de diferenças estatísticas.

5.2. Tempo de indução , Tempo de retorno e Sobrevivência.

Para o tempo de indução foi observado diferença significativa para os tratamentos de Benzocaína 40mg./L, Eugenol 6 ml./L e conjugação entre Eugenol e Sal (6ml./L + 10g.). Provavelmente esse anestésico obteve maior eficiência como indutores anestésicos em concentrações mais elevadas indicando uma relação direta entre aumento de concentração. Resultados semelhantes foram encontrados pelos estudos de SOTO & BURHANUDDIN (1995); ROSS & ROSS (1999) ; INOUE *et al.* (2003); VIDAL *et al.* (2006) ; OKAMOTO *et al.* (2009), tal característica de rápida indução é adequada na medida que proporciona rápido efeito como anti estressor e evita os possíveis traumas conseqüentes da manipulação dos animais , portanto quanto mais rápida a indução menor a chance de desencadear prejuízos aos animais manipulados, o que é desejável para o bem estar animal.(KUBITZA ,1999 ;ROSS & ROSS, 2009).

O tempo de exposição e a concentração dos fármacos estão relacionados com as características de interação química da droga com os seus respectivos receptores onde quanto maior o tempo de exposição e

quanto maior a quantidade de indutores há uma maior chance de indução e interação com os sítios receptores anestésicos até o limite de receptores existentes, diminuindo proporcionalmente os tempos de indução anestésica. Alguns estudos verificaram que o aumento do tempo de exposição do fármaco ou uma maior quantidade destes elementos a ser metabolizados, leva a um aumento do tempo de recuperação (MASSONI,1999 ; ROSS &ROSS ,2009).

O tempo de retorno anestésico das substâncias :Benzocaína 40mg./L, Eugenol 6 ml./L e conjugação entre Eugenol e Sal (6ml./L + 10g.) foi maior em relação aos tratamentos com menor (Tabela 4). Os tratamentos com menor concentração apresentaram tempos médios de 10 minutos para Benzocaína 20mg./L, 20 minutos para Eugenol 3 ml./L e 30 minutos para Eugenol e Sal (3ml./L + 5g) (Tabela 4), indicando uma relação inversa entre concentração anestésica e tempo de retorno anestésico. O resultado do presente experimento está de acordo com os estudos de (VIDAL ,2006 ; PARK *et al.*,2008 ; GONÇALVES *et al.* ,2008).

MASSONI (1999) verificou em seu estudo que o fármaco ideal é aquele que possibilita uma rápida recuperação do animal, assim minimizando os efeitos adversos e possíveis interações fisiológicas indesejáveis, propiciando o retorno dos reflexos e capacidades normais do animal o que reduz a chance de predação, susceptibilidade à doenças, parasitismos ou mesmo a morte do animal.

Tabela 4 – Médias de dados da ação anestésica e mortalidade

TRATAMENTO	TI (segundos)	TR (minutos)	TAXA DE MORTALIDADE		
			imediate	24 hs.	48 hs.
Benzocaína 20 mg./L	86,66b	10,00f	0,00a	0,00a	0,00a
Benzocaína 40 mg./L	30,00d	15,00e	0,00a	0,00a	0,00a
Eugenol 3ml./L	120,00a	20,00d	0,00a	0,00a	0,00a
Eugenol 6ml./L	30,00d	40,00b	0,00a	0,00a	0,00a
Eugenol + Sal (3ml./L + 5g.)	60,00c	30,00c	0,00a	0,00a	0,00a
Eugenol + Sal (6ml./L + 10g.)	33,33d	48,33a	0,00a	0,00a	0,00a
Sal 5g.	0,00e	0,00f	0,00a	0,00a	0,00a
Sal 10 g.	0,00e	0,00f	0,00a	0,00a	0,00a
Controle	0,00e	0,00f	0,00a	0,00a	0,00a

TI - tempo de indução anestésica ; TR – tempo de retorno anestésico. Obs.- valores com a mesma letra indicam inexistência de diferenças estatísticas e valores segundo análise de Tukey.

A taxa de sobrevivência imediata foi de 100% dos alevinos para todos os tratamentos testados, a taxa de sobrevivência em 24 horas e em 48 horas após o experimento igualmente foi de 100% de sobrevivência não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos(Tabela 4), os dados mostram que todos os anestésicos e sedativos utilizados são eficazes e seguros para uso em transporte cumprindo com a finalidade de manter o máximo de animais vivos e viáveis ao longo do trajeto com a capacidade de melhorar o bem estar animal e prevenir efeitos deletérios do estresse que possam comprometer a vida dos animais até 48 horas após soltura no novo ambiente ,os dados estão de acordo com os resultados obtidos com uso das mesmas substancias feitos por (ROSS & ROSS ,1999 ;CARNEIRO,2002; ;TAKAHASHI,2006 ;HISANO *et. al* ,2008; OKAMOTO,2008; OLIVEIRA,2009 e OKAMURA ,2010) .

Essas informações poderão nortear novos experimentos, melhorar as condições de transporte, diminuir o stress causado pela manipulação, valorizar a atividade no sentido econômico, assim como aumentar o número de alevinos destinados à aqüicultura.

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o Cloreto de Sódio(Sal) e o Eugenol (Óleo-de-cravo) são melhores alternativas em comparação ao anestésico sintético (Benzocaína) nos quesitos de facilidade e segurança operacional tanto para os animais quanto para o manipulador , são facilmente encontrados no comércio e em farmácias de manipulação a um baixo custo , entretanto a Benzocaína apresentou valores médios comparativamente menores de tempos de indução e de retorno , oferecendo melhores funções anestésicas para o transporte nas dosagens estudadas .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU , J. S. Respostas de estresse de matrinxã (*Brycon amazonicus*) juvenil após transporte em sistema fechado sob diferentes densidades de carga, *Ciência Rural*, v.38, n.5, ago, 2008.

ADAMANTE, W.B. Estresse de juvenis de dourado e mandi sob diferentes densidades e tempos de transporte. 2005. 39 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ALLEN , J . L . Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. *Progressive Fish-Culturist*, Bethesda, v.50, n.1, p.59-60, 1988.

BALARIN, J.D. & HATTON J.P. Tilapia, a guide to their biology and culture In Africa University of Stirling, Unit of Aquatic Pathobiology, Stirling (UK), 174 p, 1979.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, RS: Editora UFSM. 2002.

BARTON, B. A. & IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Disease*. 1991.

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.

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.

BROWN, L. A. Anesthesia and restraint. In: *Fish Medicine* (STOSKOPF, M. K. ed.), p.79-90. Saunders, Philadelphia, 1993.

CAMPBELL, P.M. *et al.* Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 120, p. 151-169, 1994.

CARMICHAEL, G.J. Confinement and water quality induced stress in largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.113, p.767-777. 1984

CARNEIRO, P. C. F.& URBINATI, E.C. Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: *Aquicultura Brasil'98*, Recife. Anais. Recife, 1998. p.609-620.

CARNEIRO, P. C. F.; **URBINATI**, E.C. “Stress” e crescimento de peixes em piscicultura intensiva. In: III Simpósio Internacional Sobre Manejo e Nutrição de peixes Campinas. Anais. Campinas: CBNA, 1999. p.25-40.

CARNEIRO, P. C. F. Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon cephalus*, Jaboticabal, SP. 139 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), 2002.

CARRAGHER, J.F. *et al.*: The deleterious effect of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout *Salmo trutta* L and *Salmo gairdneri* Richardson. Gen. Comp. Endocrinol., 76, 310, 1989.

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura de água doce. Jaboticabal. FUNEP, 189p., 1992.

CHERVINSKI, J. Environmental physiology of tilapias. In R.S.V. Pullin and R.H. The biology and culture of tilapias. ICLARM Conf. Proc. 7, 360 p. 1982.

COYLE, S.D.; *et al.* Evaluation of growth, feed utilization, and economics of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, fed diets containing different protein source in combination with distillers dried grains with solubles. Aquaculture Research, v. 35, p. 365-370, 2004.

DELBON M. C. Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, Jaboticabal, SP. 91 p. Tese (mestrado em Biologia), 2006.

DERIGGI, G. F.; **INOUE**, L. A. K. A.; **MORAES**, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (*Linuacus*): Assessment of eugenol as an alternative anesthetic. Acta Sci. Biol. Sci., v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

EL-SAYED ALI, T.; *et al.* Primeros ensayos de determinación Del consumo de oxígeno de juveniles de tilápia (*Oreochromis niloticus*, L.) bajo diferentes condiciones de temperatura y frecuencia alimentaria. , p.885-880, 2003.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2002. Guidance for industry: status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. FDA, Guide 150, Washington, D.C.

FURUYA, W.M. *et al.* Espécies nativas. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas :ULBRA, 2004.

GIMBO, R. Y.; *et al.* Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.9, n.2, p. 350-357, abr/jun, 2008.

GOMES, L.C.; *et al.* 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 tambaqui. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, p. 283-290, 2003.

GONCALVES, A. F. N.; *et al.* Mentol e eugenol como substitutos da benzocaina na inducao anestésica de juvenis de pacu. Acta Scientiarum. Animal Science, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GROTTUM, J. A.; *et al.* Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. Aquaculture Research, Oxford, v. 28, n. 2, p. 159-164, 1997.

GUPTA, M. V. & ACOSTA, B. O. A review of global tilapia farming practices. Vol. 9 Issue 1, pages 7-12 , 2004.

HEW, C.L. Transgeni fish: present status and future directions. Fish Physiology. Biochem., v.7, p.1-4. 1989.

HIKASA, Y.; *et al.* 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.

HONCZARYC A. & INOUE A.K.A. Anestesia do pirarucu por aspersão da benzocaína diretamente nas brânquias. Cienc. Rural vol.40 no.1 Santa Maria Jan./Feb. 2010 Epub Nov 27, 2009.

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.

INOUE, L. A. K. A.; *et al.* Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). Ciência Rural, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

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.

KILDEA, M. A.; *et al.* 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.

KIRK, W.L. The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Transactions of the American Fisheries Society, v.103, p.593-600. 1974.

KUBITZA, F. Transporte de Peixes Vivos. São Paulo. S. P. 2000.

KUBITZA, F. Amenizando as perdas de alevinos após o manejo e o transporte. Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro, v. 13, n. 80 p. 15-25, nov./dez., 2003.

LI, P. et al. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. Aquaculture 251:141–152, 2006.

MASSONE, F. Anestesiologia Veterinária - Farmacologia e técnicas, 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 225 p.

MAZEAUD, M.M.; Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. Transactions of the American Fisheries Society, v. 106, p.201-212. 1977.

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

MEINERTZ, I. R. Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the fish anesthetic benzocaine. *G. Xenobiotics in fish*. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 1999.

MELLO, R. A. Avaliação de 2-Fenoxietanol e Mentol em juvenis de Tilapias, *Oreochromis niloticus*. Dissertação mestrado .Lavras MG,2010.

MOYLE, P.B., & J.J. CECH, Jr. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall., 1996.

MUIR, W. W.; Handbook of veterinary anesthesia. 2º edição. Missouri, EUA, 510p, 1995.

MYLONAS, C. C.; et al. 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.

NOGUEIRA, Alex C. Criação de Tilápias em Tanques-Rede. SEBRAE , 2008.

OKAMOTO ,M. H. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*.*Rev.Cienc.Rural* vol.39 no.3 SantaMaria RS,20.

OKAMURA , D. *et al.* Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.5, p.971-976, 2010.

OLFERT, E.D. & CROSS, B.M. Anesthetic and sedative drug dosage- fishes. Guide to the care and use of experimental animals. 2.ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993. p.192.

OLIVEIRA , A. M. B. M. S. Estresse dos peixes em piscicultura intensiva , Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical Intensiva , 1999.

OLIVEIRA, J. R. . Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia - do - nilo . *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38 ,n.7 ,p.1163 - 1169 ,2009.

OSTRENSKY, A.; *et al.* Situação atual da Aqüicultura brasileira e mundial. p. 354 – 381., J.B. Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia. 399 p., 2000.

PARK, M.O., *et al.* Anesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aqua. Res.*, 39: 877-884,2008.

PEDRAZZANI, A.S. *et al.* M.Senciência e bem-estar de peixes: Uma visão de futuro do mercado consumidor. *Panorama da Aqüicultura*: 24 – 29. 2007.

PICKERING, A .D. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, v.111, p.51-63. 1993.

PICKERING, A. D. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7:253-258. 1987.

RANDALL, D. J.;*et al.* Effect of an anaesthetic on the heart and respiration of teleost fish. *Nature*, v.195, 1972.

ROSS, L. G. & ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Oxford: BlackwellScience, 1999. 159 p.

ROSS, L. G.& ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed.Blackwell, London, UK. 222 p., 2009.

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. 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.

SIMÕES, L.N. & GOMES, L.C. Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, n.12, p.1472-1477, 2009.

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.

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.

STAURNES, M.; et al. Physiological effects of simulated high density transport of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, v.119, p.381-391. 1994.

TAKAHASHI, L.S. Efeito do ambiente pós transporte na recuperação dos indicadores de stresse de Pacus juvenis, *Piractus mesopotamicus*. Maringá, 2006.

TAYLOR, P.W.& ROBERTS, S.D. Clove oil: An alternative anaesthetic for aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, v. 61, p. 150–155, 1999

URBINATI, E.C.& CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P, Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. 1. ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004, p. 171 – 194

VIDAL, L.V.O.. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuço (*Leporinus macrocephalus*). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v.29, p.357-362, 2007.

VIDAL, L. V. O.; et al. Eugenol como anestesico de tilapia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela, 370 p. 2003.

WAGNER, E.; *et al.* 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.

WANDELAAR BONGA, B. S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, p. 591-625, 1998.

WILKIE, M. P. & WOOD, C. M. The effects of extremely alkaline water (pH 9.5) on rainbow trout gill function and morphology. *J. Fish. Biol.* v. 45, p. 87-98, 1994.

WILKIE, M. P.; LAURENT, P.; WOOD, C. M. Differential regulation of Na⁺ and Cl⁻ movements across rainbow trout gills: the influence of highly alkaline (pH = 9.5) water. *Physiol. Biochem. Zool.* v. 72, p. 360-368, 1999.

WOHLFARTH, G.W. & HULATA, G.I. Applied genetics of tilapias. *ICLARM Studies and Reviews Manila, Philippines*, v.6, 26p. 1981.

WOODY, C. A.; *et al.* Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, 2002.

WOOLSEY, J., M. *et al.* Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. *North American Journal of Aquaculture* 66:35–41, 2004.

WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture*, v. 26, p. 80-81, 1995.