



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ANESTESIA EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)
EXPOSTOS A SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
DE PLANTAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mauro Alves da Cunha

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**ANESTESIA EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)
EXPOSTOS A SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
DE PLANTAS**

por

Mauro Alves da Cunha

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal/Fisiologia de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANESTESIA EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS**

Elaborada por

Mauro Alves da Cunha

Requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)
(Presidente / Orientador)

Levy de Carvalho Gomes, Dr. (UVV)

Adriano Bonfim Carregaro, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007

DEDICATÓRIA

À minha Mãe Liane, pela força estímulo e apoio em todos os momentos...

E meu Pai João Pillar, pelo caráter, amor, carinho, apoio e pelo exemplo passado...

Aos meus avós pelo incentivo ao estudo e pelos ensinamentos herdados...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha esposa, amiga e companheira Carla, sem o seu apoio e seu amor seria impossível realizar este sonho...

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Departamento de Zootecnia da UFSM, pela oportunidade da realização do Curso de Pós-graduação.

A capes pela bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Bernardo Baldisserotto, pela orientação com sabedoria, pelo convívio, dedicação, interesse e amizade no decorrer de todos estes anos.

Aos funcionários do Departamento Fisiologia e Farmacologia e do departamento de Zootecnia, em especial a Sr^a Olirta pela disponibilidade e interesse em ajudar.

Ao inesquecível convívio com os amigos e colegas, Alexssandro, Carlos e Luciano no decorrer do curso e pelo auxílio na condução dos experimentos e da dissertação.

A Deus por tudo que alcançamos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Produção Animal

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ANESTESIA EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS

AUTOR: Mauro Alves da Cunha

ORIENTADOR: Bernardo Baldisserotto

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007.

Existem alguns anestésicos efetivos para peixes, mas é importante buscar novas alternativas de substâncias de fácil aquisição e baixo custo aos piscicultores e que não ofereçam aos animais e manipuladores riscos à saúde. Portanto, este trabalho verificou a utilização de algumas substâncias extraídas de plantas como agentes anestésicos, e se efetivos também avaliar seus efeitos sobre o estresse em jundiás (*Rhamdia quelen*). Para identificar o tempo de indução e recuperação anestésica foram utilizados juvenis de jundiá, os quais foram colocados em aquários com 1 L de água contendo diferentes concentrações de óleo de cravo (*Eugenol*), óleos essenciais extraídos das plantas: *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citricola*, *Calea clematidea*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus lentiscifolius* e *Lithraea brasiliensis* ou extratos de *Condalia buxifolia*. Após a indução, os peixes foram transferidos para aquários livres de anestésicos para avaliar de jundiá foram submetidos a 50 mg/L de óleo de cravo ou 4 mg/L de extrato metanólico de *C. buxifolia* e expostos ao ar por 1 min. O sangue foi coletado 0, 1 e 4 h após a exposição ao ar e alguns exemplares do tempo 0 h foram abatidos para testes de avaliação sensorial do filé. Os resultados obtidos mostraram que o óleo de cravo é uma alternativa segura como anestésico para o jundiá na concentração de 50 mg/L pois reduz o cortisol plasmático no momento da exposição ao ar, mas deixa um sabor levemente desagradável ao filé. O extrato metanólico de *C. buxifolia* pode ser usado para sedação de jundiás, mas não chega a levar à anestesia e não minimiza o estresse da manipulação, pois não altera os níveis de cortisol em relação aos controles. Demais substâncias testadas não apresentaram efeito anestésico.

Palavras chave: *Rhamdia quelen*, anestesia, cortisol, estresse.

ABSTRACT

Animal Husbandry Master Dissertation
Post-Graduate in Animal Husbandry
Universidade Federal de Santa Maria

ANESTHESIA IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO SUBSTANCES ISOLATED FROM PLANTS

Author: Mauro Alves da Cunha

Adviser: Bernardo Baldisserotto

Date and Place of Defense: February 23rd, 2007, Santa Maria

There are some effective anesthetics for fishes, but it is important to search new alternatives of substances easily obtained, of low cost for fish farmers and with no risk to fish and human health. Therefore, this study analyzed the use of some substances extracted from plants as anesthetics, and if effective also evaluating their effects on the stress of silver catfish (*Rhamdia quelen*). To identify time of induction and anesthetic recovery, silver catfish juveniles were placed in aquaria containing different concentrations of clove oil (*Eugenol*), essential oils extracted from plants: *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citricola*, *Calea clematidea*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus lentiscifolius* and *Lithraea brasiliensis* or extracts obtained from *Condalia buxifolia*. After induction, fish were transferred to anesthetic-free aquaria to evaluate recovery time. To determine the levels of plasma cortisol, juveniles were exposed to 50mg/L of clove oil or 4mg/L of *C. buxifolia* methanolic extract and exposed to air for 1 min. Blood was collected 0, 1 and 4 h air exposure and some specimens were killed at time 0h for sensorial evaluation of the fillet. The results obtained showed that clove oil is a safe alternative as an anesthetic to silver catfish at concentration of 50mg/L, as it reduces plasma cortisol when the fish is exposed to air. However, it leaves a slightly unpleasant taste in the fillet. The *buxifolia* methanolic extract can be used to sedate silver catfish, but it did not induce anesthesia either decrease stress during handling, as it did not alter cortisol levels compared to controls. Other tested substances did not demonstrate any anesthetic effect.

Key Words: *Rhamdia quelen*, anesthesia, cortisol, stress.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1** Tempo de indução à sedação (A) e anestesia (B) profunda em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo 39
- FIGURA 2** Níveis de cortisol plasmático de jundiás (*Rhamdia quelen*) anestesiados com óleo de cravo e expostos ao ar por 1 min 40

CAPÍTULO II

- FIGURA 1** Tempo de indução à sedação leve em juvenis de jundiá com extrato de *Condalia buxifolia* 58
- FIGURA 2** Níveis de cortisol plasmático de jundiás em diferentes tempos de coleta, expostos ao extrato de *Condalia buxifolia* 59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1	Estágio de anestesia em peixes (Schoettger e Julin, 1967) ..	36
TABELA 2	Tempo de indução e recuperação anestésica (s) aos diferentes estágios de anestesia, segundo Schoettger and Julin, 1967, utilizando diferentes concentrações de óleo de cravo (tempo máximo de observação 30 mim)	37

CAPÍTULO II

TABELA 1	Estágio de anestesia em peixes (Schoettger e Julin, 1967) ..	56
-----------------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
3. OBJETIVOS GERAIS.....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO I	
Anestesia de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) com óleo de cravo: tempo de indução, estresse e análise sensorial do filé	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e Métodos	23
Resultados	26
Discussão	28
Referências Bibliográficas	32
CAPÍTULO II	
Indução e recuperação anestésica em jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) expostos a substâncias isoladas de plantas	41
Resumo	42
Abstract	43
Introdução	44
Material e Métodos	45
Resultados	49
Discussão	50
Referências Bibliográficas	53
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades agropecuárias que mais cresceu no Brasil. Graças aos recentes avanços tecnológicos na produção de alevinos das espécies nativas e à viabilização da comercialização de peixes através dos pesque-pagues, supermercados, feiras e frigoríficos, a quantidade de peixes vivos, manejada rotineiramente no país, é bastante grande, chegando à ordem de 120 mil toneladas ao ano (Scorvo-Filho, 2002).

No entanto, é bastante comum o relato de prejuízos econômicos expressivos devido à mortalidade decorrente das deficiências gerais de manejo. Algumas práticas realizadas na aqüicultura como biometria, análises patológicas, implantes hormonais e transporte, freqüentemente expõem peixes a uma variedade de fatores estressantes que têm o potencial de afetar seu desempenho (Barton, 2000). O conhecimento de métodos que permitam intervenções com o mínimo de interferência nas funções vitais e fisiológicas dos peixes é importante a fim de que a mortalidade seja mínima durante o transporte ou manejo.

A resistência, característica dos peixes durante a captura, tem efeitos fortes sobre os aspectos fisiológicos e comportamento, e o uso de anestésicos é um método para minimizar o estresse dos danos físicos (Berka, 1986). Qualquer estímulo apresentado a um peixe causa uma ou mais mudanças de comportamento e fisiológicas, e estas mudanças dentro do laboratório ou a campo se refletem em diminuição da alimentação e conseqüente atraso no crescimento e mortalidade (Barton, 1997).

Para facilitar operações de manejo, transporte e pesquisa das diferentes espécies de peixes tem-se utilizado anestésicos. Entretanto a dose, tempo de indução e recuperação, bem como os efeitos adversos que podem causar ainda não foram determinados para a maioria das espécies utilizadas em aqüicultura (Ross e Ross, 1999). A escolha de um anestésico deve estar relacionada com sua viabilidade econômica, praticidade no uso e eficácia (Cho e Heath, 2000). Substâncias químicas como metanosulfonato de triclaína (MS 222) são utilizadas amplamente em anestesia, porém apresentam muitas inconveniências como irritação das brânquias, danos córneos e também alguns transtornos aos trabalhadores pela necessidade de utilização de luvas. Nos últimos anos, foi reconhecido o óleo de cravo (*Eugenol*) como um anestésico efetivo para sedar

peixes em procedimentos de manejo e pesquisa (Soto e Burhanuddin, 1995; Anderson et al., 1997). Coletivamente, uma gama de estudos disponível sugere que o óleo de cravo é uma alternativa efetiva para a sedação de peixes, e pode ter vários benefícios sobre outros métodos que incluem seu baixo custo.

Neste trabalho foi utilizado o jundiá (*Rhamdia quelen*) por ser uma espécie bem adaptada e comumente encontrada em cursos de água no sul do Brasil com bons resultados em condições de cativeiro e excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para a alimentação. Portanto, informações referentes ao comportamento de jundiás expostos a diferentes anestésicos podem contribuir para o melhor manejo desses animais e o crescimento da piscicultura nacional. Nesta espécie há apenas estudo com benzocaína, um anestésico local (Seigneur, 1984). Neste trabalho foram utilizados o óleo de cravo e outros diversos óleos essenciais e substâncias retirados de plantas, na tentativa de se reconhecer uma opção alternativa para piscicultores, de fácil utilização e baixo custo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A anestesia é um processo reversível que provoca perda de sensação de todo ou em parte do corpo e que resulta em depressão da função nervosa, causada por um fármaco. Os anestésicos são agentes químicos ou físicos, que com o aumento da exposição ou concentração, primeiro acalmam (sedam) um animal e depois causam perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e finalmente, das reações reflexas por evitarem o início e condução do impulso nervoso (Summerfelt e Smith, 1990).

A avaliação dos diferentes estágios de anestesia que um agente anestésico para peixes pode induzir é bastante subjetiva e muitas vezes é difícil diferenciar o momento da passagem de um estágio de anestesia para outro (Gilderhus e Marking, 1987). Essa depende de uma série de fatores, como habilidade do manipulador dos peixes, dos procedimentos a serem realizados e de outros parâmetros (Burka et al., 1997). Claramente deve-se também considerar fatores biológicos e ambientais ao administrar ou ao comparar estudos referentes ao uso dos agentes anestésicos (Burka et al., 1997; Ross e Ross, 1999). Os fatores biológicos incluem a espécie, idade, tamanho, peso, condições fisiológicas e presença ou não de parasitas e doenças. Todos estes fatores afetam a taxa metabólica e conseqüentemente a farmacocinética dos compostos do anestésico. Os fatores ambientais como a temperatura e o pH também afetam o metabolismo dos peixes, e conseqüentemente aumentam ou diminuem a eficácia de um agente do anestésico (Burka et al., 1997; Ross e Ross, 1999).

2.1 Anestésicos derivados de plantas

Nos últimos anos tem-se buscado alternativas para a anestesia em peixes, e o óleo de cravo (*Eugenol*), por exemplo, foi reconhecido como um anestésico efetivo e de baixo custo para sedar peixes em procedimentos de manejo e pesquisa (Soto e Burhanuddin, 1995; Anderson et al., 1997). Tem seu uso principalmente em odontologia e medicina como um anti-séptico, analgésico e agente anestésico (Davidson et al., 2000). Vários estudos comparam os efeitos fisiológicos do óleo de cravo contra os de anestésicos convencionais, entre eles o MS 222, e constataam seu

rendimento semelhante e perturbações fisiológicas mínimas frente a fatores estressantes externos (Cho e Heath, 2000; Sladky et al., 2001; Wagner et al., 2003).

A erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), é originária da América, provavelmente do México, sendo atualmente cosmopolita. No Brasil é amplamente disseminada (Correa, 1984; Morgan, 1994; Cruz, 1995), sendo muito utilizada como inseticida e tem efeitos no sistema nervoso central (Lagunes & Rodriguez, 1989). Os óleos essenciais de eucalipto como o *Eucalyptus citricola*, são compostos formados por uma complexa mistura de componentes orgânicos voláteis, freqüentemente envolvendo de 50 a 100 ou até mais componentes isolados, e apresentando grupos químicos como: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres (Charles e Simon, 1990). O óleo tem sido utilizado popularmente como relaxante, entre outras atividades (Boland et al., 1991; Chaibi et al., 1997; Oyedeji et al., 1999).

O gênero *Calea* compreende cerca de 100 espécies cultivadas na região tropical e sub-tropical da América. *Calea clematidea* é um arbusto nativo bem adaptado nas regiões sul do Brasil e no Uruguai. No Rio Grande do Sul é tradicional o seu uso pelas pessoas locais como anti-gripal e no tratamento para o catarro. Clematol é o principal componente do óleo essencial isolado da *C. clematidea* (Flach et al., 2002). *Schinus terebenthifoli*, popularmente conhecida como aroeira-vermelha, é uma árvore de folhas perenes, com 4 a 6 metros de altura e originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são a casca, folhas e frutos, com ação antidiarréica e antiinflamatória entre outras. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios e como relaxante muscular, no tratamento da diarréia e inflamações (Degáspari et al., 2005). *Schinus leutiscifolius*, ou popular aroeira-cinzenta, é uma árvore de folhas perenes, com 5 a 7 metros de altura, existente no Paraguai e Brasil. Popularmente também é empregada no tratamento da diarréia, dores musculares e inflamações (Degáspari et al., 2005).

Lithraea brasiliensis, popularmente conhecida como aroeira-bugre ou aroeira-brava, é uma árvore perene de 4 a 10 de altura, presente em toda a América do Sul (Backes e Irgang, 2002). Em virtude do tanino que suas cascas possuem, o cozimento desta é empregado na medicina popular para controlar fortes diarréias e dores musculares (Marquesini, 1995). O gênero *Condalia* compreende 18 espécies

distribuídas em todo continente americano, e *Condalia buxifolia* é uma árvore de aproximadamente quatro metros de altura, sendo encontrada no Brasil, Uruguai e Argentina. É usada na medicina popular como antitérmico, antiinflamatório e antidiarréico (Morel et al., 2002).

2.2 Estresse e cortisol

Muitos estudos descrevem o estresse em peixes através das elevações do cortisol e glicose plasmática em resposta a imposição de diversos estímulos adversos a homeostase. Atualmente, esses buscam a relação entre o estresse fisiológico dos peixes e as condições de suas células. Esse enfoque foi primeiramente relatado através do aumento das concentrações plasmáticas de cortisol e glicose em peixes de água fria submetidos a aumentos repentinos de temperatura da água (Ackerman et al., 2000; Zarate e Bradley, 2003; Iwama et al., 2004). A influência do cortisol e as alterações na gliconeogênese e na glicogenólise são algumas das respostas ao estresse mais estudadas em peixes (Davis e Griffin, 2003; Small, 2004; Barcellos et al., 2006)

Seguido ao aumento do cortisol plasmático, observa-se o aumento dos teores de glicose plasmática, que pode ser originária de diversos mecanismos do metabolismo (Mommsen et al., 1999). O aumento do cortisol plasmático resulta em aumento dos parâmetros cardíacos e respiratórios em peixes (Iwama et al., 1997; Barreto e Volpato, 2004). E estes aumentos são facilmente observados durante as operações de manipulação na aquicultura.

2.3 Análise sensorial

A análise sensorial é uma ciência interdisciplinar na qual se convidam avaliadores, que se utilizam da complexa interação dos órgãos dos sentidos (visão, gosto, tato e audição) para mensurar as características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios e muitos outros materiais (Watts et al., 1992). Os métodos sensoriais são baseados nas respostas aos estímulos, que produzem sensações cujas dimensões são intensidade, extensão, duração, qualidade e prazer ou desprazer. Enquanto os estímulos podem ser medidos por métodos físicos e químicos, as sensações são medidas por processos psicológicos. A análise

sensorial vem sendo aplicada no desenvolvimento e melhoramento de produtos, controle de qualidade, estudos sobre armazenamento e desenvolvimento de processos (Moraes, 1993). Lanzillotti e Lanzillotti (1999) descrevem ainda que a análise sensorial é timidamente empregada em alimentação coletiva na avaliação de preparações alimentares, como também auxiliando no desenvolvimento de novos produtos.

2.4 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá é uma espécie encontrada em quase toda a América do Sul e Central, tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul. A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita e a revisão de Silfvergrip (1996) já apresenta algumas contestações (Baldisserotto, 2004). A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. *R. quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (Guedes, 1980). No Brasil, a cultura do jundiá esta aumentando, mas os dados estatísticos são incompletos ou simplesmente inexistentes. Para a maioria dos países da América Latina os dados da produção indicam somente "catfishes", e conseqüentemente não é possível identificar que espécies estão sendo levantadas. A produção de peixe no Brasil durante o ano de 2000 foi de 176.000 t desta 2.500 t, (1,4%) são referentes ao jundiá (Baldisserotto, 2003).

3. OBJETIVO GERAL

Identificação de substâncias alternativas retiradas de plantas para serem utilizadas em anestesia de peixes, verificando também seu efeito em indicadores fisiológicos de estresse.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a concentração ideal e o tempo para indução e recuperação de jundiás frente a diferentes substâncias originadas de plantas com potencial de induzir anestesia.

Verificar o efeito das substâncias que se revelarem efetivas na anestesia sobre o cortisol plasmático, para analisar sua ação na resposta ao estresse.

Verificar se as substâncias testadas deixam resíduos de sabor e/ou odor diferenciado no filé.

CAPÍTULO 1

ANESTESIA DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) COM ÓLEO DE CRAVO: TEMPO DE INDUÇÃO, ESTRESSE E ANÁLISE SENSORIAL DO FILÉ

Mauro Alves da Cunha^{1*}, Luciano de Oliveira Garcia¹, Vania Lucia Loro², Milene Braga da Fonseca², Tatiana Emanuelli³, Ana Paula de Lima Veeck³, Bernardo Baldisserotto¹.

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria – RS, cep 97105-900, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria – RS, cep 97105-900, Brasil.

³ Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria – RS, cep 97105-900, Brasil.

*Autor, e-mail para correspondências: mauroalves_@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar o tempo de indução e recuperação anestésica de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao óleo de cravo (*Eugenol*), sua eficiência como redutor de estresse e realizar análise sensorial do filé após a exposição a esta substância. Para identificar o tempo de indução e recuperação anestésica juvenis ($2,14 \pm 0,01$ g e $7,0 \pm 0,1$ cm) foram colocados em aquários com 1 L de água contendo diferentes concentrações de óleo de cravo diluídas em etanol (1:20). Após a indução, os animais foram transferidos para aquários livres de anestésicos para avaliar o tempo para recuperação. Os níveis de cortisol plasmático foram determinados em exemplares de $176,96 \pm 7,58$ g e $26,0 \pm 0,6$ cm, divididos em dois tratamentos: óleo de cravo (50 mg/L) e controle (sem anestésico). Os jundiás foram expostos ao ar por 1 min para realização de biometria e o sangue foi coletado 0, 1 e 4 h após. Não foi observada nenhuma diferença no tempo de recuperação nas diferentes concentrações testadas. O etanol, quando utilizado em separado, nas mesmas concentrações, não apresentou efeito. O grupo controle apresentou níveis significativamente mais elevados de cortisol no tempo zero que 1 e 4 h após a biometria. Não houve diferença significativa nos níveis de cortisol entre os diferentes tempos após anestesia. Portanto, o óleo de cravo evita o aumento do cortisol sanguíneo. Pode-se utilizar o óleo de cravo na faixa de 20 a 50 mg/L para indução à anestesia em jundiás, sendo que a concentração de 50 mg/L induz rapidamente a anestesia sem causar mortalidade durante a indução ou recuperação anestésica.

Palavras chave: *Eugenol*, Óleo de cravo, *Rhamdia quelen*, anestesia, cortisol, estresse.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify time of induction and anesthetic recovery of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to clove oil (*Eugenol*), its efficiency as a stress reducing agent and to perform a sensory analysis of the meat after exposure to this substance. To identify the time of induction and anesthetic recovery, juvenile silver catfish ($2,14 \pm 0,01$ g e $7,0 \pm 0,1$ cm) were placed in 1 L aquaria containing different concentrations of clove oil, diluted in ethanol (1:20). After induction, fish were transferred to anesthetic-free tanks to evaluate recovery time. The levels of plasma cortisol were determined in juveniles of $176,96 \pm 7,58$ g and $26,0 \pm 0,6$ cm, divided in two treatments: clove oil (50 mg/L) and control (anesthetic-free). The silver catfish were exposed to air for 1 min to carry out biometry and blood was collected at 0, 1 and 4 hours later. Recovery time of anesthesia was not affected by clove oil concentration. Ethanol, when used separately at the same concentrations, did not show any effect. The control group showed significant higher cortisol levels at moment zero than at 1 and 4 hours after biometry. There was no significant difference on cortisol levels among the different moments after anesthesia. Therefore, clove oil inhibits the cortisol rise in blood. The clove oil can be use in the 20 - 50 mg/L range for induction of anesthesia in silver catfish, and the concentration of 50 mg/L induces anesthesia quickly without causing mortality during induction or anesthesia recovery.

Key Words: *Eugenol*, Clove oil, *Rhamdia quelen*, anesthesia, cortisol, stress.

1. INTRODUÇÃO

A criação de jundiá (*Rhamdia quelen*) envolve algum grau de estresse ambiental e físico aos peixes. Um dos desafios para o produtor está na manutenção dos peixes saudáveis e na produção de um produto de qualidade. As técnicas da cultura e os procedimentos diferentes da manipulação podem afetar extremamente o grau de estresse dos peixes.

Atualmente, as técnicas de manejo e os procedimentos da manipulação para jundiás comerciais não envolvem o uso de sedativos. Entretanto, com o aumento do interesse pela qualidade do produto, faz-se necessário seu uso para reduzir o estresse dos peixes durante procedimentos de manipulação. Os anestésicos são usados freqüentemente em pesquisa para facilitar o manejo e reduzir o estresse dos peixes. Além de impedir ferimento físico determinados anestésicos podem reduzir ou obstruir a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, resultando em diminuição da liberação de cortisol, o qual causa várias respostas secundárias do estresse, incluindo aumento dos níveis plasmáticos de glicose e lactato (Rotllant et al., 2001; Skjervold et al., 2001). Altos níveis de cortisol plasmático provocam diminuição na capacidade imunológica em salmões (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Maule et al., 1989; Pickering e Pottinger, 1989) e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Davis et al., 2002, 2003). O aumento da glicose e lactato plasmáticos são indicativos da mobilização do glicogênio, e está associado com uma qualidade pobre e rigor de filés de peixes (Skjervold et al., 1999, 2001; Silva e Nunez, 2001).

O óleo de cravo é um anestésico derivado da destilação de partes da planta do gênero *Eugenia* que tem como princípio ativo o eugenol, um depressor do sistema nervoso central (SNC) (Anderson et al., 1997). As concentrações de óleo de cravo necessárias para a indução anestésica variam conforme a espécie. Em bagre

do canal e bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Stehly e Gingerich, 1999), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Iversen et al 2003), truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss*) (Endo et al., 1972; Keene et al, 1998), pacu vermelho (*Piaractus brachypomus*) (Sladky et al., 2001). Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Cho e Heath, 2000), largemouth bass (*Micropterus salmoides*) (Cooke et al., 2004) as concentrações de óleo de cravo ficam na faixa de 10-50 mg/L. Portanto, a finalidade deste estudo foi determinar a melhor concentração do óleo de cravo para anestesia do jundiá, avaliando-se o tempo de indução anestésica e recuperação. Além disso, verificou-se o efeito do óleo de cravo nos níveis plasmáticos de cortisol de jundiás expostos a fatores estressantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Juvenis de jundiás machos/fêmeas foram obtidos da Piscicultura Bela Vista (Santa Maria, RS, Brasil). Os juvenis foram transportados até o Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos por duas semanas em tanques de 250 L continuamente aerados, com temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$; pH 6,6 – 7,0; oxigênio dissolvido 5,8 – 7,2 mg/L.

Indução e recuperação anestésica

Juvenis ($2,14 \pm 0,01\text{g}$ e $7,0 \pm 0,1\text{ cm}$) ficaram em jejum por 24 h e após foram transferidos para aquários contendo 1 L de água e óleo de cravo em diferentes concentrações (em mg/L): 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70. Foram realizados testes com óleo de cravo (Eugenol, Odontofarma, Porto Alegre, Brasil) diluído em etanol (1:20) e também testes com o óleo de cravo aplicado diretamente na água, bem

como testes utilizando apenas o etanol nas mesmas concentrações das diluições. Em cada aquário foram colocados 2 peixes por vez para avaliação do tempo para indução a anestesia de acordo com Schoettger e Julin (1967) (Tabela 1). Após a indução, foi realizada a biometria dos animais e em seguida os mesmos foram transferidos para aquários livres de anestésico para avaliar o tempo de recuperação anestésica. Foram utilizados 20 juvenis para cada concentração a ser testada, e cada juvenil foi utilizado apenas uma vez.

Avaliação da permanência no estado de anestesia.

Após um jejum prévio de 24h utilizou-se as concentrações de 40 e 50 mg/L de óleo de cravo diluído em etanol (1:20) para a indução ao estágio 4 de anestesia (veja resultados) em 32 juvenis ($18,56 \pm 1,48$ g e $15,0 \pm 0,6$ cm) (8 para cada teste) em dois tempos: 10 e 15 min. Após os jundiás estarem anestesiados conforme metodologia descrita no item anterior, foram colocados individualmente em calhas onde uma bomba submersa fornecia um fluxo constante de água através das brânquias, possibilitando a oxigenação do sangue durante o experimento, mesmo com a interrupção completa dos movimentos operculares. Decorrido o tempo estipulado, observou-se o tempo de recuperação anestésica.

Determinação de cortisol plasmático

Juvenis de jundiá ($176,96 \pm 7,58$ g e $26,0 \pm 0,6$ cm) permaneceram em jejum de 24 h e foram divididos em dois tratamentos: óleo de cravo diluído em etanol (1:20) (50 mg/L) (concentração estabelecida no experimento de indução e recuperação anestésica) e controle (sem anestésico) e 3 tempos de coleta de sangue (0, 1 e 4 h), para cada tratamento, sendo utilizados 8 exemplares diferentes

para cada tempo. Foi então realizada a indução anestésica em aquário contendo 5 L de água (1-2 min), um peixe por vez, e realizada a biometria (tempo de exposição ao ar – 1 min) e coleta de sangue da veia caudal (tempo 0). Os exemplares correspondentes aos tempos 1 e 4 h também foram submetidos à biometria, mas após a realização desta foram colocados em tanques de 250 L. A coleta de sangue destes exemplares foi efetuada respectivamente 1 e 4 h após a indução anestésica. O sangue coletado foi armazenado em tubos plásticos de 2 ml e permaneceu em banho-maria à temperatura de 37°C durante o tempo decorrido para a coleta de todos os animais. Após o término da coleta as amostras de sangue foram centrifugadas para separação do plasma sanguíneo e posteriormente este foi mantido sob refrigeração constante. O cortisol plasmático foi determinado pelo teste de ELISA através do kit EIAgenTM CORTISOL-test (BioChem ImmunoSystems). Os animais pertencentes ao grupo 0 horas foram submetidos à eutanásia por secção da medula logo após a coleta de sangue para coleta do filé, o qual foi utilizado posteriormente para a realização de análise sensorial.

Análise sensorial

As amostras de filés dos dois tratamentos (controle e anestesiados com eugenol) foram cozidas em forno microondas (20 gramas/1 min) e após, oferecidas aos provadores em pratos plásticos, codificados com três algarismos aleatórios. As amostras foram avaliadas quanto aos atributos de sabor e odor, por 26 julgadores não treinados. O julgamento das amostras foi realizado pelo teste de comparação múltipla (ABNT, 1995), em que foi avaliada a diferença (melhor, igual ou pior) e o grau de diferença (leve, moderado ou grande) das três amostras-teste em relação à amostra-controle (não tratada), segundo um atributo específico. Foi atribuído valor 1

para muito melhor que o controle, 2 para moderadamente melhor que o controle, 3 para levemente melhor que o controle, 4 para igual ao controle, 5 para levemente pior que o controle, 6 para moderadamente pior que o controle e 7 para grandemente pior que o controle.

Análise estatística

Nos testes para indução e recuperação anestésica foram realizadas análises de regressão (concentração óleo de cravo x tempo de indução da anestesia; concentração óleo de cravo x tempo de recuperação da anestesia) utilizando o programa "Slide Write Plus" (Advanced Graphics Software), 1996. Para os testes de avaliação de estresse, os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Como as variâncias foram homogêneas, a comparação estatística entre os diferentes grupos e tempos foi efetuada por análise de variância (ANOVA) de dois fatores e teste de Tukey através do programa STATISTICA versão 5.1., com nível mínimo de significância de 95% ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos nos testes de análise sensorial foram avaliados por análise de variância de uma via e teste de Tukey.

3. RESULTADOS

As concentrações de 5 e 10 mg/L de óleo de cravo não apresentaram nenhum efeito anestésico durante 30 minutos de avaliação. Nas demais concentrações testadas o aumento da concentração diminuiu proporcionalmente o tempo necessário para indução aos estágios 2 e 4 de anestesia (Figuras 1A e 1B). Na faixa de 20 a 50 mg/L a indução e recuperação anestésica pode ser efetuada sem que ocorresse mortalidade, mas na concentração de 60 e 70 mg/L verificou-se

mortalidade de 20 e 65%, respectivamente, durante o retorno da indução anestésica.

Não foi observada nenhuma diferença no tempo de recuperação nas diferentes concentrações. Também não foi encontrada diferença significativa no tempo de indução e recuperação anestésica em juvenis de diferentes tamanhos (2 a 177 g) induzidos ao estágio 4, com 50 mg/L de óleo de cravo (tabela 2). O etanol, quando utilizado em separado, nas mesmas concentrações, não apresentou efeito anestésico, e não houve diferença significativa nos tempos de indução anestésica para a utilização de óleo de cravo diluído ou não em etanol.

Durante um tempo pré-determinado (10 e 15 min), os animais permaneceram no estado de anestesia no sistema construído para possibilitar sua respiração, não ocorrendo mortalidade em nenhum dos peixes testados em nenhum dos tratamentos e também não existindo diferença significativa no tempo de recuperação anestésica dos tratamentos.

Jundiás do grupo controle no tempo zero apresentaram níveis significativamente mais elevados de cortisol que os anestesiados com óleo de cravo no mesmo tempo e em relação aos do grupo controle no tempo 4h. Não houve diferença significativa entre os demais tempos e tratamentos (Figura 2).

Os filés obtidos de jundiás anestesiados com óleo de cravo apresentaram odor semelhante ao controle (peixe não tratado), mas o sabor foi considerado significativamente pior que o controle (leve a moderadamente), com valor de $5,68 \pm 0,29$ na escala do teste de comparação múltipla.

4. DISCUSSÃO

Indução e recuperação anestésica

O óleo de cravo vem sendo apontado como uma alternativa aos anestésicos tradicionais, pois é um óleo natural e de uso seguro (Soto & Burhanuddin, 1995; Sladky et al., 2001). O estágio 2 de anestesia é considerado como um valor ideal para o transporte dos peixes (Cooke et al., 2004). O mesmo autor, pesquisando concentrações anestésicas em largemouth bass descreve que valores entre 5 e 8,5 mg/L de óleo de cravo são ideais para o transporte destes peixes. Em nosso estudo as concentrações de 20, 30 e 40 mg/L obtiveram respectivamente as médias de 307, 139 e 61 s para indução ao estágio 2 de anestesia em jundiás. Apesar do tempo para a indução a este estágio ser maior para a concentração de 20 mg/L, concentrações até este valor parecem ser a ideal para o transporte de jundiás pois não são capazes de aprofundar o estágio anestésico por um tempo de observação superior a 30 min.

Iversen et al (2003), estudando a eficácia do óleo de cravo em salmão do Atlântico, verificaram efeito anestésico nos peixes somente em concentrações superiores a 30 mg/L durante um tempo de exposição dos peixes ao óleo de 20 min; em jundiás este mesmo efeito só foi alcançado com valores maiores que 20 mg/L por um tempo de observação superior a 30 min. O efeito do óleo de cravo varia conforme a espécie: a concentração de 10,8 mg/L de óleo de cravo foi capaz de induzir o estágio 4 de anestesia em catfish americano em um tempo médio de 5,3 min, mas a mesma concentração em bluegill induz ao mesmo estágio em 1,2 min (Stehly e Gingerich, 1999). Para induzir o estágio 4 de anestesia em 2-6 min a concentração de óleo de cravo fica na faixa de 20-50 mg/L para juvenis de salmões (Cho e Heath, 2000), truta arco-íris (Endo et al., 1972; Keene et al., 1998) e pacu

vermelho (Sladky et al., 2001). Já em salmão do atlântico para induzir ao estágio 4 de anestesia foi necessário um tempo de $8,1 \pm 2,2$ min em concentrações que variaram de 30 a 100 mg/L (Iversen et al., 2003).

Um bom efeito em relação à rapidez para a indução ao estágio 4 de anestesia e segurança em jundiás foi verificado na concentração de 50 mg/L, que teve como média 111 s e não ocorreram mortes nos animais testados, e por este motivo foi considerada a mais indicada para ser utilizada para indução a este estágio de anestesia.

Como indicado acima, a eficácia de um anestésico é dependente de diversos fatores. O tamanho parece também ser correlacionado positivamente com a eficiência do anestésico. A eficácia geralmente aumenta com o tamanho (Olsen et al., 1995), mas no caso do jundiá não foi verificada diferença significativa no tempo de indução anestésica em relação ao tamanho dos peixes.

Avaliação de cortisol plasmático

Iversen et al. (2003) descrevem que o óleo de cravo contém o componente ativo eugenol, e não se sabe como este componente afeta a dinâmica do cortisol plasmático nos peixes. É razoável supor, entretanto, que a transmissão da informação sensorial ao hipotálamo seja obstruída. Uma das respostas principais dos peixes às situações adversas é a produção de catecolaminas e corticosteróides, os quais são responsáveis por mudanças fisiológicas e bioquímicas, caracterizadas geralmente como a resposta ao estresse. Níveis de cortisol em peixes não estressados variam de 5 a 51 ng/mL e, depois do estresse agudo de 30 a 309 ng/mL (Barton e Iwama, 1991; Davidson et al., 2000). Portanto, os valores encontrados no nosso experimento nos exemplares controle (6,16 – 10,21 ng/mL) estão nos níveis

inferiores da faixa determinada por Barton e Iwama (1991), demonstrando que mesmo com o manuseio não houve uma situação muito estressante para os jundiás. A secreção do cortisol é dependente da severidade e do valor do estressor aplicado (Sumpter et al., 1985). Em jundiás cronicamente estressados o pico de cortisol se dá 1h após a exposição a um novo fator estressante (Barcellos et al., 2006). No nosso estudo esta situação não é tão evidente, pois os níveis de cortisol plasmático nos tempos 0 e 1h após o manuseio não apresentaram diferença significativa, sendo assim não foi possível verificar o momento do pico de cortisol no plasma. Em jundiás o nível de cortisol de repouso em peixes sofrendo estresse crônico é 23.80 ± 5.45 ng/mL, significativamente menor que o nível de cortisol de peixes estressados cronicamente e que recebem um fator estressante agudo (55.23 ± 11.44 ng/mL) (Barcellos et al, 2006).

A exposição aérea dos jundiás por 1 min provocou um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, evidenciando uma resposta aguda ao estresse, pois os valores do grupo controle 4h após a biometria foram mais baixos, retornando a valores semelhantes aos da pré-anestesia. Resposta semelhante na redução do cortisol plasmático foi observada em jundiás expostos previamente a fatores estressantes crônicos, 4h após estes serem submetidos a um estresse agudo (Barcellos et al., 2006).

Avaliação da permanência no estado de anestesia.

Nosso intuito com este estudo foi verificar a possibilidade de manter os juvenis de jundiá anestesiados por um tempo suficiente para ser possível realizar algum tipo de intervenção com tempo mais prolongado. Para poder respirar, peixes de nado lento, como o jundiá, utilizam um sistema de bombeamento de água através

das brânquias e um aumento da cavidade opercular através de um movimento de expansão lateral dos opérculos (Baldisserotto, 2002). O problema da permanência dos peixes no recipiente com anestésico após a obtenção do estágio 4 é que rapidamente ocorre a passagem ao estágio subsequente. Sendo assim cria-se um impasse para a tentativa de algum tipo de técnica que necessite um tempo maior de duração como processos cirúrgicos, pois com o aprofundamento anestésico ao estágio 5 pode ocorrer a parada dos movimentos operculares e conseqüente morte.

Verificamos a possibilidade de manter os peixes anestesiados por um longo tempo e como não houve mortalidade em nenhum dos 32 exemplares de jundiá utilizados para a realização dos testes, pode-se concluir que com a manutenção de oxigenação aos peixes é possível induzir ao estágio 4 de anestesia e manter este estágio por um tempo de 15 min ou mais.

Análise sensorial

Alguns autores relatam que o óleo de cravo não deixa resíduos tóxicos na carne (Soto & Burhanuddin, 1995; Sladky et al., 2001). Contudo, os testes de análise sensorial dos filés de jundiá demonstraram que o óleo de cravo piora o seu sabor, de modo que o seu uso não é indicado para anestesia no momento do abate se houver utilização da carne para alimentação. Não existem na literatura testes específicos sobre a análise sensorial do file de peixes após a utilização de anestésicos.

O óleo de cravo é um anestésico efetivo para a anestesia de jundiás podendo ser utilizado nas concentrações de 50 mg/L sem causar problemas aos peixes e aos manipuladores, porém deve-se ter cuidado caso o file seja utilizado para consumo após a anestesia, pois o óleo de cravo deixa um sabor desagradável ao filé.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 13526. Métodos de análise sensorial de alimentos e bebidas. São Paulo, 1995.
- Anderson, W.G., McKinley, R.S., Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North Am. J. Fish. Manage. 17, 301– 307.
- Baldisserotto, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM. p. 44-47.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. Aquaculture 253, 317– 321.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis. 10, 3 – 26.
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquac. Res. 31, 537–546.
- Cooke, S.J., Suski, C. D., Ostrand, K. G., Tufts, B. L., Wahl, D. H. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture 239, 509-529.
- Davidson, G.W., Davie, P.S., Young, G., Fowler, R.T., 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui-Sk. J. World Aquac. Soc. 31 (1), 105– 114.

- Davis, K.B., Griffin, B.R., Gray, W.L., 2002. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture* 214, 55–66.
- Davis, K.B., Griffin, B.R., Gray, W.L., 2003. Effect of dietary cortisol on resistance of channel catfish to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus disease. *Aquaculture* 218, 121–130.
- Endo, T., Ogishima, K., Tanaka, H., Ohshima, S., 1972. Studies on the anaesthetic effect of euglenol in some fresh water fishes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 38, 761–767.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqu-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221, 549–566.
- Keene, J.L., Noakes, D.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 29, 89–101.
- Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L., Schreck, C.B., 1989. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* 120, 135–142.
- Olsen, Y.A., Einarsdottir, I.E., Nilssen, K.J., 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture* 134, 155–168.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253–258.

- Rotllant, J., Balm, P.H, Perez-Sanchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333–342.
- Schoettger, R.A., Julin, M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Invest. Fish Contr., U.S. Dept. Int.* 13, 1 –15.
- Silva, J.L., Nunez, A.L., 2001. Onset of rigor and freshness quality of channel catfish fillets as affected by preprocessing, handling, and transport. *Aquaculture 2001: Book of Abstracts, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA* p. 592.
- Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Oestby, P.B., 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture* 175, 93– 101.
- Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Oestby, P.B., Einen, O., 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 192, 265– 280.
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanosulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachpomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337– 342.
- Soto, C.G., Burhanuddin, G., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 135, 149–152.
- Stehly, G.R., Gingerich, W.H., 1999. Evaluation of Aqui-Sk (efficacy and minimum toxic concentration) as a anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquac. Res.* 30, 365– 372.

Sumpter, J.P., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1985. Stress-induced elevation on plasma α -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta L.* Gen. Comp. Endocrinol. 59, 257–265.

Tabela 1 - Estágio de anestesia em peixes (Schoettger e Julin, 1967)

Estágio	Descrição	Características
1	Sedação leve	Perda parcial da reação aos estímulos externos.
2	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, nenhuma reação aos estímulos externos.
3a	Perda total do equilíbrio	Os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação.
3b	Perda total do equilíbrio	A habilidade da natação para, mas responde à pressão no pedúnculo caudal.
4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes.
5	Colapso medular (morte)	O movimento respiratório cessa (morte).

Tabela 2 - Tempo de indução e recuperação anestésica aos diferentes estágios de anestesia, segundo Schoettger and Julin 1967, utilizando diferentes concentrações de óleo de cravo (tempo máximo de observação 30 mim).

Concentração (mg/L)	Tempo de indução(s) ao estágio 2	Tempo de indução(s) ao estágio 3a	Tempo de indução(s) ao estágio 3b	Tempo de indução(s) ao estágio 4	Tempo de recuperação (s)
5	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
20	136,0 ± 19,2	319,4 ± 54,3	417,0 ± 29,7	888,3 ± 60,1	254,3 ± 32,5
30	131,2 ± 15,1	307,5 ± 28,5	414,6 ± 25,3	823,1 ± 51,8	251,0 ± 19,9
40	70,2 ± 9,8	139,1 ± 13,5	202,0 ± 15,8	320,2 ± 18,3	271,2 ± 59,8
50	27,1 ± 4,5	61,75 ± 11,7	87,6 ± 16,7	111,6 ± 32,2	206,4 ± 22,5
60	25,4 ± 10,7	42,3 ± 13,3	59,7 ± 12,3	101,7 ± 10,0	260,2 ± 26,0
70	16,2 ± 2,17	24,7 ± 2,2	41,9 ± 4,32	66,2 ± 5,2	355,7 ± 43,9

Legenda das figuras

Figura 1 – Tempo de indução à sedação (A) e anestesia (B) profunda em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo.

$$A - y = 35,62 + \frac{288,72}{\left(1 + \left(\frac{x}{38,04}\right)^{10,34}\right)}$$

$$r^2 = 0,996$$

$$B - y = 87,23 + \frac{763,05}{\left(1 + \left(\frac{x}{37,71}\right)^{13,78}\right)}$$

$$r^2 = 0,998$$

y = tempo para anestesia (s)

x = concentração de óleo de cravo (mg/L)

Figura 2 – Níveis de cortisol plasmático de jundiás (*Rhamdia quelen*) anestesiados com 50 mg/L de óleo de cravo diluído em etanol (1:20) e expostos ao ar por 1 min.

* Diferença significativa em relação ao controle, tempo 0 h (P < 0,05).

+ Diferença significativa em relação ao tempo 0 h no mesmo grupo (P < 0,05).

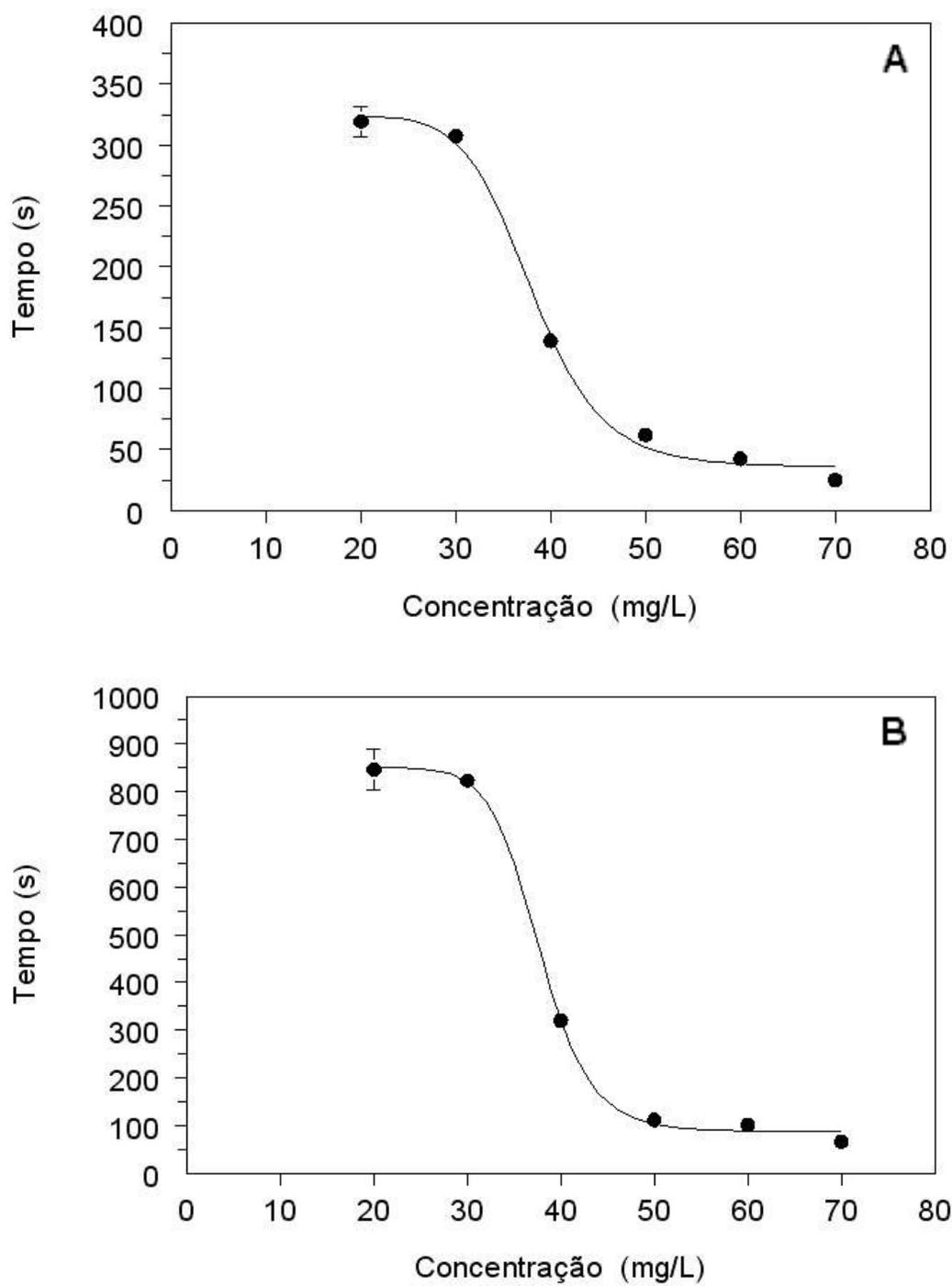


Figura 1

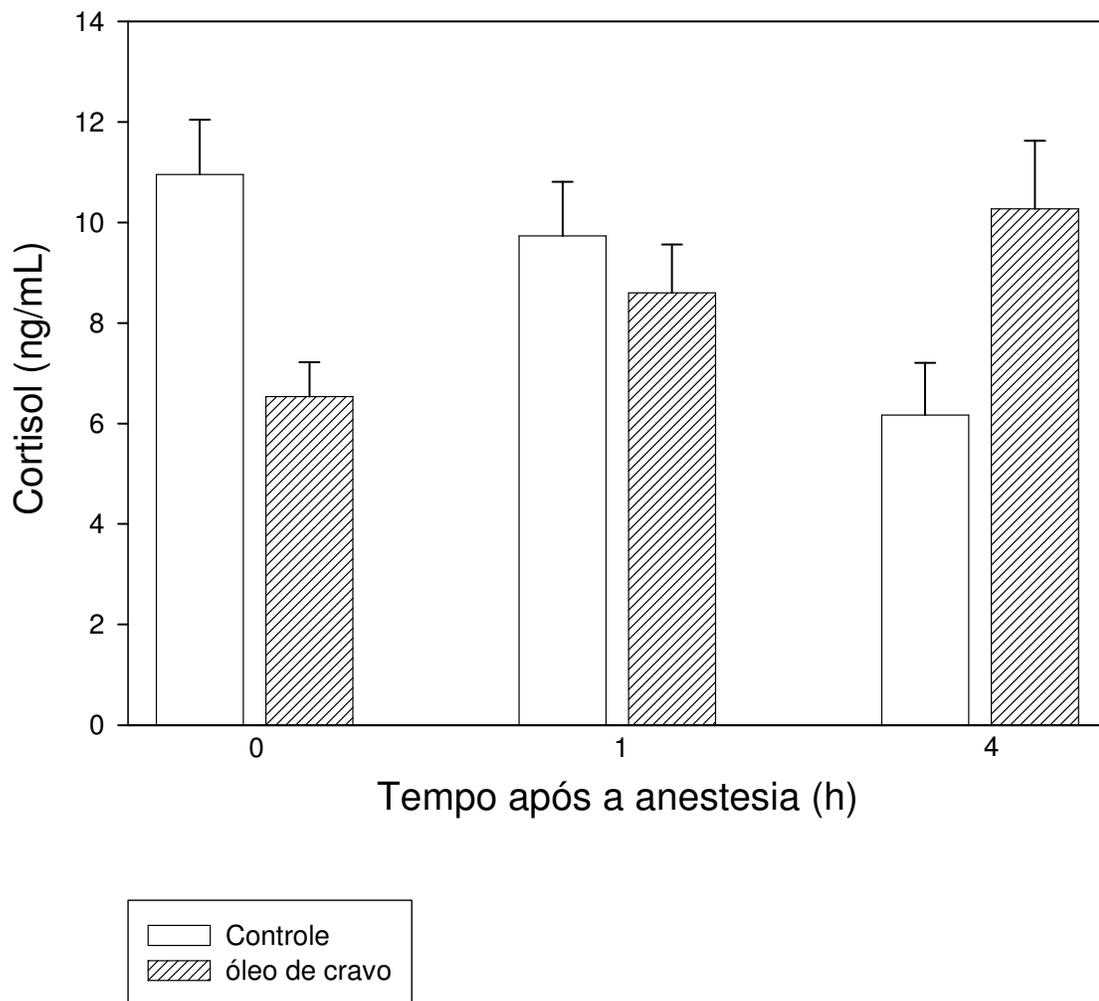


Figura 2

CAPÍTULO 2

ANESTESIA EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS: TEMPO DE INDUÇÃO, ESTRESSE E ANÁLISE SENSORIAL DO FILÉ

Mauro Alves da Cunha^{1*}, Luciano de Oliveira Garcia¹, Vania Lucia Loro², Milene Braga da Fonseca², Ademir F. Morel², Graciela Maldaner², Bernardo Baldisserotto¹.

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria – RS, cep 97105-900, Brasil.

² Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria – RS, cep 97105-900, Brasil.

*Autor, e-mail para correspondências: mauroalves_@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar a eficácia anestésica de compostos originados de plantas e determinar os níveis de cortisol plasmático em jundiás após a exposição a compostos efetivos avaliando sua eficiência como redutor de estresse. Para identificar o tempo de indução e recuperação anestésica, juvenis de jundiá foram colocados em aquários com 1 L de água contendo diferentes concentrações de extrato de *Condalia buxifolia* e óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citricola*, *Calea clematidea*, *Schinus terebinthifolius*, *Schinus lentiscifolius* e *Lithraea brasiliensis* diluídas em DMSO (1:10) ou etanol (1:10). Após a indução, os peixes foram transferidos para aquários livres de anestésicos para avaliar o tempo para recuperação. Dentre todos os compostos testados apenas o extrato metanólico de *C. buxifolia* induziu uma sedação leve. Os níveis de cortisol plasmático foram determinados em jundiás (176,96 ± 7,58 g e 26,0 ± 0,6 cm) 0, 1 e 4 h após serem submetidos a dois tratamentos: extrato metanólico de *C. buxifolia* diluído em DMSO (1:10) (4 mg/L) e controle (sem anestésico), e expostos ao ar por 1 min para biometria. Não houve diferença significativa entre os diferentes tempos avaliados nos tratamentos nem entre os tratamentos em nenhum dos tempos analisados. Conclui-se que o extrato metanólico de *C. buxifolia* não evita o aumento do cortisol plasmático. Como ocorreu apenas a tranquilização dos animais expostos ao extrato metanólico de *C. buxifolia* e não houve a indução para a anestesia em nenhuma das concentrações testadas por um tempo superior a 30 min, sugere-se a utilização deste extrato como tranquilizante e não como agente anestésico.

Palavras chave: *Condalia buxifolia*, *Rhamdia quelen*, anestesia, cortisol, estresse.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the anesthetic efficiency of compounds from plants and to determine the plasmatic cortisol levels in silver catfish after being exposure to effective compounds, evaluating their efficiency as a stress reducing agent. To identify the time of induction and anesthetic recovery, juvenile silver were placed in 1 L aquaria containing different concentrations of *Condalia buxifolia* extracts and essential oils of diluted in DMSO (1:10) or ethanol (1:10). After induction, fish were transferred to compound-free tanks to evaluate recovery time. The methanolic extract of *C. buxifolia* was the only compound that induced slight sedation. The levels of plasma cortisol were determined in silver catfish (176.96 ± 7.58 g and 26.0 ± 0.6 cm) 0, 1 and 4 h after being submitted to two treatments: exposed to methanolic extract of *C. buxifolia* (4 mg/L) and exposed to air for 1 min for biometry. There was neither significant difference between the different moments evaluated in the treatments nor between the treatments in any of the evaluated moments. It is possible to conclude that the methanolic extract of *C. buxifolia* did not inhibit cortisol rise in the plasma. Since fish exposed to the methanolic extract *C. buxifolia* showed only tranquilizing effects with exposure for 30 min and there was no anesthetic induction in any tested concentrations, it is suggested the use of this extract as a tranquilizing and not as an anesthetic agent.

Key words: *Condalia buxifolia*, *Rhamdia quelen*, anesthesia, cortisol, stress.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias que possibilitem induzir algum tipo de relaxamento ou até mesmos níveis de anestesia mais aprofundados em peixes tem sido relativamente estudado (Gilderhus e Marking, 1987; Soto e Burhanuddin, 1995; Anderson et al., 1997; Iversen et al., 2003; Façanha e Gomes, 2005). Em seus estudos estes pesquisadores procuram uma alternativa de fácil aquisição e baixo custo aos piscicultores e que não ofereça riscos à saúde dos peixes e manipuladores, além de possibilitar um manejo mais tranquilo, pois qualquer estímulo apresentado a um peixe pode causar mudanças comportamentais e fisiológicas, as quais se refletem em diminuição da alimentação e conseqüente atraso no crescimento e mortalidade (Barton, 1997).

Óleos essenciais normalmente possuem propriedades bactericida, antivirótica, cicatrizante, analgésica, relaxante, expectorante e antiespasmódica. Como exemplo tem-se mentol nas hortelãs, timol no tomilho e alecrim pimenta, ascaridol na erva-de-santa-maria, etc (Martins et al., 1994). O uso de óleos essenciais como anestésicos para peixes parece ser uma alternativa viável frente ao alto custo e dificuldades de obtenção dos produtos químicos utilizados para esta finalidade (Façanha e Gomes, 2005). Nos últimos anos, foi reconhecido o óleo essencial de cravo (eugenol) como um anestésico efetivo para várias espécies (Soto e Burhanuddin, 1995; Anderson et al., 1997), inclusive o jundiá (*Rhamdia quelen*) (Cunha et al., em preparação). No entanto, esse anestésico piora o sabor do filé do jundiá, tornando seu uso não recomendado logo antes do abate (Cunha et al., em preparação). O óleo essencial de *Mentha* também pode ser utilizado de forma viável como uma alternativa anestésica em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Façanha e Gomes, 2005). Dentro desta idéia de encontrar substâncias viáveis para anestesia

em jundiás foi verificado o tempo de indução anestésica de alguns óleos essenciais e extratos de plantas existentes no sul do Brasil, bem como o efeito no cortisol plasmático da que se revelou efetiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Juvenis de jundiás machos/fêmeas foram obtidos da Piscicultura Bela Vista (Santa Maria, RS, Brasil). Os juvenis foram transportados até o Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria e mantidos por ao menos duas semanas em tanques de 250 L continuamente aerados, com temperatura 21 ± 1 °C; pH 6,6 – 7,0; oxigênio dissolvido 5,8 – 7,2 mg/L.

Agente anestésico

Foram testados óleos essenciais extraídos das plantas *Chenopodium ambrosioides* (*Chenopodiaceae*), *Eucalyptus citricola* (*Myrtaceae*), *Calea clematidea* (*Asteraceae*), *Schinus terebentifolius*, *Schinus lentiscifolius* e, *Lithraea brasiliensis* (*Anacardiaceae*) e o extrato de *Condalia buxifolia* (*Rhamnaceae*), bem como as frações metanólica, hexânica, acetato de etila, e diclorometano deste extrato.

Todos estes exemplares foram coletados na região centro-sul do Estado do Rio Grande do Sul. A identificação do material botânico foi realizada através de comparações com amostras já existentes no herbário do Departamento de Biologia – UFSM.

Extração e fracionamento

Os óleos essenciais das plantas *C. ambrosioides*, *E. citricola*, *C. clematidea*, *S. terebentifolia*, *S. Leutiscifolius* e *L. brasiliense* foram extraídos por meio da técnica de arraste a vapor em Cleverger modificado, como descrito por Flach et al. (2002).

As cascas da raiz e caule (5,7 kg) de *C. buxifolia* foram secas sob a ação da luz branca de uma lâmpada de 100w a 50°C e moídas a fino grão em moinho Wiley. Este material seco foi colocado sob refluxo com metanol por 6 horas, filtrado com papel filtro e o material filtrado concentrado de modo a obter-se o extrato metanólico. Deste foi retirado uma quantidade para fazer uma solução aquosa, da qual foi extraída à quente sob refluxo, com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila) obtendo-se assim as seguintes frações com seus respectivos rendimentos: hexânica (35g), diclorometano (23g), acetato de etila (17g) e metanólica (12g).

Indução e recuperação anestésica

Os óleos essenciais de *C. ambrosioides* (partes aéreas), *E. citricola* (partes aéreas), *C. clematidea* (partes aéreas), *S. terebentifolius* (fruto verde), *S. lentiscifolius* (fruto maduro), e *L. brasiliensis* (partes aéreas), bem como os extratos de *C. buxifolia* (casca da raiz e casca do caule) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (1:10) e/ou etanol (1:10) e testados separadamente. Cada uma destas substâncias foi aplicada em aquários contendo 1 L de água, em concentrações que variaram de 5 a 100 mg/L (óleos essenciais) ou 0,05 a 300 mg/L (extratos de *C. buxifolia*). Em cada aquário foram colocados dois juvenis de jundiá ($1,50 \pm 0,02$ g e $7,0 \pm 0,1$ cm) em jejum de 24 h, para avaliação do tempo para indução à anestesia de acordo com Schoettger e Julin (1967) (Tabela 1). A ação das diferentes

substâncias foi observada por um período de até 30 min. Foram utilizados 20 peixes para cada concentração a ser testada de cada substância e cada juvenil foi utilizado apenas uma vez.

Após a indução, foi realizada a biometria dos animais e em seguida os mesmos foram transferidos para aquários livres de anestésico para avaliar o tempo para recuperação anestésica. Foram também realizados testes utilizando-se apenas o DMSO e o etanol em separado.

Determinação de cortisol plasmático

Juvenis ($176,96 \pm 7,58$ g e $26,0 \pm 0,6$ cm) permaneceram em jejum de 24 h foram divididos em dois tratamentos: extrato de *C. buxifolia* diluído em DMSO (1:10) (4 mg/L), (concentração estabelecida no experimento de indução e recuperação anestésica) e controle (sem anestésico), e 3 tempos de coleta de sangue (0, 1 e 4 h), para cada tratamento, sendo utilizados 8 exemplares diferentes para cada tempo. Foi então realizada a indução anestésica em aquário contendo 5 L de água (1-2 min), um peixe por vez, e realizada a biometria (tempo de exposição ao ar – 1 min) e coleta de sangue da veia caudal (tempo 0). Os exemplares correspondentes aos tempos 1 e 4 h também foram submetidos à biometria, mas após a realização desta foram colocados em tanques de 250 L. A coleta de sangue destes exemplares foi efetuada respectivamente 1 e 4 h após a indução anestésica. O sangue coletado foi armazenado em tubos plástico de 2 mL, e permaneceu em banho-maria a 37°C durante o tempo decorrido para a coleta de todos os animais. Após o termino da coleta as amostras de sangue foram centrifugadas para separação do plasma sanguíneo e posteriormente este foi mantido sob refrigeração constante. O cortisol plasmático foi determinado por kit EIAgenTM CORTISOL-test (BioChem

ImmunoSystems). Os animais pertencentes ao grupo 0 hora foram abatidos por secção da medula logo após a coleta de sangue para coleta do filé, o qual foi utilizado posteriormente para a realização de análise sensorial.

Análise sensorial

As amostras de filés dos dois tratamentos foram cozidas em forno microondas (20 gramas/1 min) e após, oferecidas aos provadores em pratos plásticos, codificados com três algarismos aleatórios. As amostras foram avaliadas quanto aos atributos de sabor e odor, por 26 julgadores não treinados. O julgamento das amostras foi realizado pelo teste de comparação múltipla (ABNT, 1995), onde foi avaliada a diferença (melhor, igual ou pior) e o grau de diferença (leve, moderado ou grande) das três amostras-teste em relação à amostra-controle (não tratada), segundo um atributo específico. Foi atribuído valor 1 para muito melhor que o controle, 2 para moderadamente melhor que o controle, 3 para levemente melhor que o controle, 4 para igual ao controle, 5 para levemente pior que o controle, 6 para moderadamente pior que o controle e 7 para grandemente pior que o controle.

Análises estatísticas

Nos testes para indução e recuperação anestésica foram realizadas análises de regressão (concentração do extrato metanólico de *C. buxifolia* x tempo de indução da anestesia; concentração do extrato metanólico de *C. buxifolia* x tempo de recuperação da anestesia;) utilizando o programa “Slide Write Plus” (Advanced Graphics Software), 1996. Para os testes de avaliação de estresse, os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Como as variâncias foram homogêneas, a comparação estatística entre os

diferentes grupos e tempos foi efetuada por análise de variância (ANOVA) de dois fatores e teste de Tukey através do programa STATISTICA versão 5.1., com nível mínimo de significância de 95% ($P < 0,05$). Os resultados obtidos nos testes de análise sensorial foram avaliados por análise de variância de uma via e teste de Tukey.

3. RESULTADOS

Indução e recuperação anestésica

Os óleos essenciais de *C. ambrosioides*, *E. citricola*, *C. clematidea*, *S. terebentifoli*, *S. leutiscifoliu* e *L. brasiliense* não apresentaram nenhum efeito anestésico sobre os jundiás durante o período de observação (30 min).

O extrato metanólico de *C. buxifolia* causou apenas uma tranquilização leve (estágio 1) nos animais expostos às concentrações entre 1 e 120 mg/L. Nas demais concentrações testadas não foi observada qualquer alteração no comportamento dos peixes por um tempo de até 30 min de observação. Também observou-se que o tempo para a tranquilização aumenta conforme aumenta a concentração do extrato metanólico a partir de 10 mg/L (Figura 1), sendo que com 4 mg/L parece ser mais facilmente percebido o estado de tranquilização nos animais testados. O DMSO e as frações de *C. buxifolia*, nas mesmas concentrações do extrato, não apresentaram efeito quando testados em separado.

Não houve diferença significativa nos níveis de cortisol plasmático nos jundiás sedados com extrato metanólico de *C. buxifolia* em relação aos animais controles (Figura 2).

Os resultados obtidos no teste de comparação múltipla indicaram que os filés de jundiás expostos ao extrato metanólico de *C. buxifolia* por 1-2 min apresentaram odor e sabor semelhante aos controles.

4. DISCUSSÃO

Indução e recuperação anestésica

A busca por novas substâncias capazes de induzir a anestesia em peixes foi o que motivou a realização deste estudo. Anestésicos são úteis para reduzir ou minimizar o estresse ao peixe e a escolha do anestésico geralmente depende de várias considerações: disponibilidade, custo, facilidade de uso, estado físico e segurança para o usuário (Cho e Heath, 2000).

Diversas substâncias e combinações de substâncias como álcool, éter, barbitúricos, quinaldine, metanosulfonato de tricaína (MS 222), clorbutanol e benzocaína foram usadas para induzir a anestesia em peixes e apresentaram efeitos colaterais sistêmicos não desejados e margens de segurança limitadas, de modo que o uso destas combinações diferentes foi limitado ou rejeitado (Gilderhus e Marking, 1987).

Neste estudo testaram-se óleos essenciais de várias plantas devido a sua disponibilidade de coleta na região e por algumas utilizações na medicina popular destas mesmas plantas, que poderiam sugerir que em sua composição existissem substâncias capazes de induzir algum efeito anestésico. *C. ambrosioides* é utilizado popularmente como inseticida, causando efeitos sobre o sistema nervoso central (Lagunes & Rodriguez, 1989), e por este motivo suspeitou-se que pudesse ter efeito sedativo ou até mesmo anestésico. O óleo essencial de eucalipto (*E. citricola*) foi testado, pois é utilizado popularmente como relaxante (Chaibi et al., 1997; Oyedeji et

al., 1999). Na região de existência da *C. clematidea* ela é bastante utilizada como anti-gripal e no tratamento para o catarro (Flach et al., 2002). As plantas *S. terebentifolius*, *S. lentiscifolius* e *L. brasiliensis*, foram testadas pois todas estas popularmente possuem ação miorreloxante (Degáspari al., 2005).

Nos testes com diversas concentrações do extrato metanólico de *C. buxifolia* não foi possível verificar o tempo de recuperação uma vez que não houve efeito anestésico. Como ocorreu apenas a tranqüilização dos animais e não houve a indução para a anestesia em nenhuma das concentrações testadas por um tempo superior a 30 min, sugere-se a utilização deste extrato como tranqüilizante e não como agente anestésico. Como as demais frações de *C. buxifolia* não apresentaram efeito anestésico quando testadas em separado, conclui-se que a ação deste extrato se dá através de sinergismo de suas frações. Como os óleos essenciais de *C. ambrosioides*, *E. citricola*, *C. clematidea*, *S. terebentifolius*, *S. lentiscifolius* e *L. brasiliensis* não apresentaram nenhum efeito sobre os animais testados, conclui-se que eles não possuem efeito anestésico sobre o jundiá.

Avaliação de cortisol plasmático

Níveis de cortisol em peixes não estressados variam de 5 a 51 ng/mL e, depois do estresse agudo, de 30 a 309 ng/mL (Barton e Iwama, 1991; Davidson et al., 2000). Portanto, os valores encontrados no nosso experimento nos exemplares controle (6,16 – 10,21 ng/mL) estão nos níveis inferiores da faixa determinada por Barton e Iwama (1991), demonstrando que mesmo com o manuseio não houve uma situação muito estressante para os jundiás. A secreção do cortisol é dependente da severidade e do valor do estressor aplicado (Sumpter et al., 1985). Em jundiás cronicamente estressados o pico de cortisol se dá 1h após a exposição a um novo

fator estressante (Barcellos et al., 2006). No nosso estudo esta situação não é evidente, pois os níveis de cortisol plasmático nos tempos 0, 1 e 4h após o manuseio não apresentaram diferença significativa.

A exposição aérea dos jundiás por 1 min provocou um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, evidenciando uma resposta aguda ao estresse que se manteve por um tempo superior a 4h, este fato pode ser verificado pelos níveis elevados de cortisol plasmático após a biometria em comparação a estudos realizados por Cunha et al., (em preparação) utilizando óleo de cravo como agente anestésico, demonstrando assim que o extrato de *C. buxifolia* não evita o aumento do cortisol plasmático.

Análise sensorial

A análise sensorial vem sendo aplicada no desenvolvimento e melhoramento de produtos, controle de qualidade, estudos sobre armazenamento e desenvolvimento de processos (Moraes ,1993). Lanzillotti e Lanzillotti, (1999) descrevem ainda que a análise sensorial é timidamente empregada em alimentação coletiva na avaliação de preparações alimentares, como também auxiliando no desenvolvimento de novos produtos. Não existem na literatura testes envolvendo análise sensorial em filés de peixes após a exposição a agentes anestésicos.

Após a realização dos testes de análise sensorial verificamos que o extrato *C. buxifolia* não altera o odor e sabor dos filés de jundiá, portanto, o seu uso pode ser indicado se houver utilização da carne para alimentação. Como ocorreu apenas a tranquilização dos animais expostos ao extrato de *C. buxifolia* e não houve a indução para a anestesia em nenhuma das concentrações testadas por um tempo superior a 30 min, sugere-se a utilização deste extrato como tranquilizante e não

como agente anestésico, porém deve-se ter alguns cuidados adicionais com os peixes pois este extrato não evita o aumento do cortisol sanguíneo.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 13526. Métodos de análise sensorial de alimentos e bebidas. São Paulo, 1995.
- Anderson, W.G., McKinley, R.S., Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North Am. J. Fish. Manage. 17, 301– 307.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. Aquaculture 253, 317– 321.
- Barton, B.A., 1997. Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), Fish Stress and Health in Aquaculture, Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 1 – 33.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis. 10, 3 – 26.
- Chaibi, A.; Ababouch, L. H.; Belasri, K.; Boucetta, S.; Busta, F. F., 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. Food Microbiology, London, v. 14, p. 161-174.

- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricane metanesuphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquac. Res.* 31, 537– 546.
- Cunha, M.A., et al., Anestesia de jundiá (*Rhamdia quelen*) com óleo de cravo: tempo de indução, estresse e análise sensorial do filé. (EM PREPARAÇÃO)
- Davidson, G.W., Davie, P.S., Young, G., Fowler, R.T., 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui-Sk. *J. World Aquac. Soc.* 31 (1), 105– 114.
- Degásparii, C.H., Waszczyński, N., Prado, M.R.M., 2005. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebentifolius* raddi. *Revista Ciência Agrotecnica Lavras*, v 29, n.3 p 617-622.
- Façonha, M.F., Gomes, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, *Characiformes: Characidae*). *Acta Amazônica*. vol. 35(1) 2005: 71-75.
- Flach, A., Grengel, B., Simionatto, E., Silva, U. F., Zanatta, N., Morel, A. Linares, C.E.B., Alves, S.H., 2002. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil *Calea clematidea*. *Planta Méd.* 68, 836-838.
- Gilderhus, P.A., Marking, L.L., 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North Am. J. Fish. Manage.* 7, 288– 292.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221, 549– 566.

- Lagunes T.A.; Rodriguez, H.C., 1989. Busqueda de Tecnologia Apropriada para el combate de plagas maiz almacenado em condiciones Rusticas. Champingo: CONACYT-CP, 150p.
- Lanzillotti, R.S., Lanzillotti, H.S., 1999. Sensorial analysis under the focus of fuzzy logic. Rev. Nutr., Campinas, 12(2): 145-157.
- Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C., Dias; J.E., 1994. Plantas medicinais. Viçosa, MG: UFV, 220p.
- Moraes, M.A.C.M., 1993. Métodos para avaliação sensorial dos alimentos. 8.ed. Campinas : UNICAMP, 93p. (Série Manuais).
- Oyedeji, A. O.; Ekundayo, O.; Olawore, O. N.; Adeniyi, B. A.; Koenig, W. A. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. Science Direct-Fitoterapia, [S.l.], v. 70, p. 526-528
- Schoettger, R.A., Julin, M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. Invest. Fish Contr., U.S. Dept. Int. 13, 1 –15.
- Soto, C.G., Burhanuddin, G., 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). Aquaculture 135, 149–152.
- Sumpter, J.P., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1985. Stress-induced elevation on plasma a-MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta L.* Gen. Comp. Endocrinol. 59, 257–265.

Tabela 1 - Estágio de anestesia em peixes (Schoettger e Julin, 1967)

Estágio	Descrição	Características
1	Sedação leve	Perda parcial da reação aos estímulos externos.
2	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, nenhuma reação aos estímulos externos.
3 ^a	Perda total do equilíbrio	Os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação.
3b	Perda total do equilíbrio	A habilidade da natação para, mas responde à pressão no pedúnculo caudal.
4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes.
5	Colapso medular (morte)	O movimento respiratório cessa (morte).

Legenda das figuras

Figura 1 – Tempo de indução à sedação leve em juvenis de jundiá com extrato de

$$Condalia\ buxifolia\ y = 222,32 + \frac{49503,44}{\left(1 + \left(\frac{x}{936,34}\right)^{-1,86}\right)}$$

$$r^2 = 0,993$$

y = tempo para anestesia (s)

x = concentração de extrato de *C. buxifolia* (mg/L)

Figura 2 – Níveis de cortisol plasmático de jundiás expostos ao extrato metanólico de *Condalia buxifolia* (4 mg/L) diluído em DMSO (1:10) em diferentes tempos de coleta.

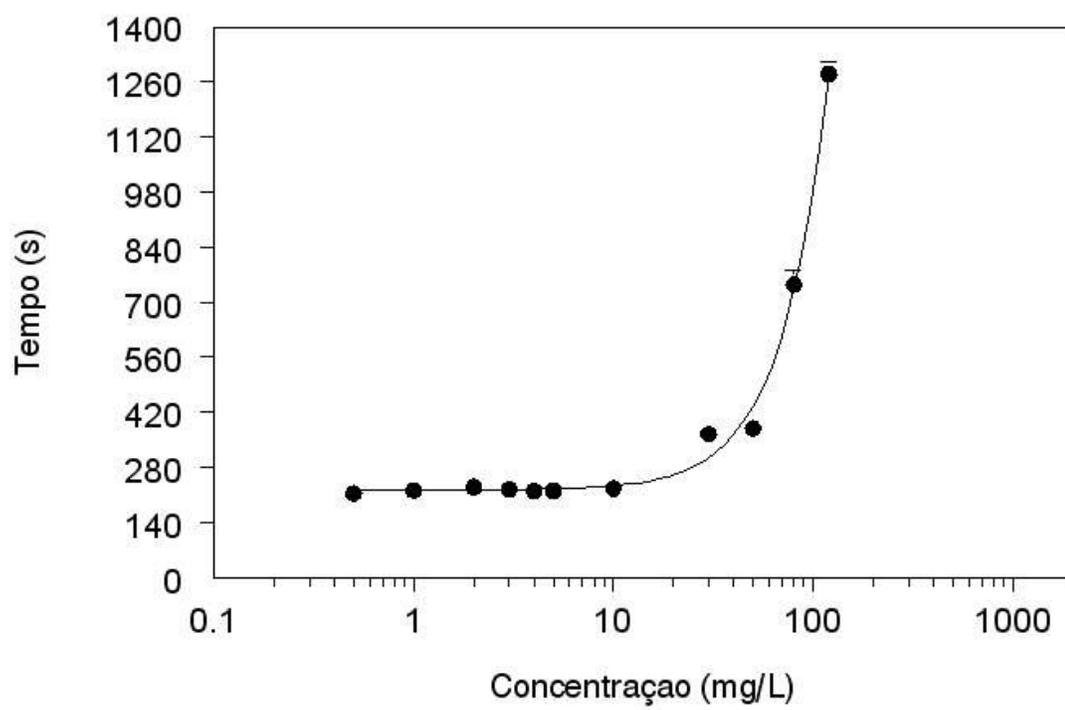


Figura 1

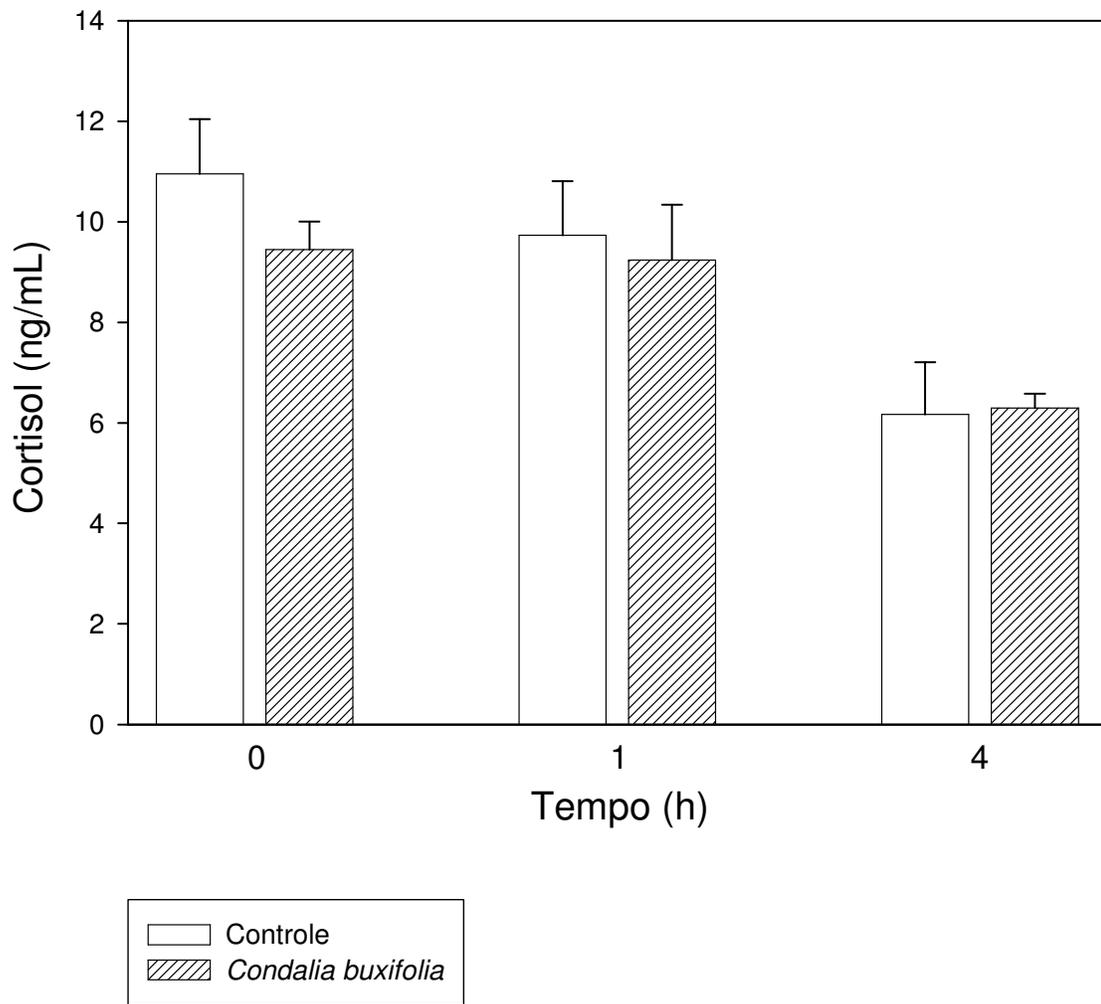


Figura 2

5. CONCLUSÕES

A concentração de 50 mg/L de óleo de cravo na água é a mais indicada para ser utilizada na indução a anestesia de jundiás porque induz rapidamente ao estágio 4 de anestesia (cerca de 111 s) e não causa mortalidade durante a indução ou recuperação da anestesia. Não foi possível verificar o tempo de recuperação nas diferentes concentrações do extrato metanólico de *C. buxifolia* uma vez que não houve efeito anestésico. Sugere-se a utilização deste extrato como tranquilizante e não como agente anestésico. O óleo essencial das demais plantas testadas não tem efeito anestésico nem tranquilizante para o jundiá.

O óleo de cravo reduz o cortisol plasmático dos jundiás no momento da exposição ao ar, diminuindo o estresse do peixe, mas o extrato metanólico de *Condalia buxifolia* não altera este parâmetro em relação ao controle, demonstrando que este extrato não possui eficiência como redutor de estresse.

O óleo de cravo piora moderadamente o sabor dos filés de jundiá não sendo, portanto, indicado o seu uso para anestesia no momento do abate se for haver utilização da carne para alimentação. O extrato metanólico de *Condalia buxifolia* não altera o sabor, de modo que não há restrições a seu uso logo antes do abate.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, P.; et al. Stress hormones and cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, p. 327-336, 2000.

ANDERSON, W.G.; MCKINLEY, R.S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North Am. J. Fish. Manage.** 17, 301– 307, 1997.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: Guia de Identificação e Interesse Ecológico. As principais espécies arbóreas sul-brasileiras. 1ª edição. Um programa: Instituto Souza Cruz Clube da Árvore, 326 p, 2002.

BALDISSEROTTO, B. The emergung silver catfish culture in latin america. **Aquaculture magazine**. v. 29, n. 5, pp 36-40, 2003.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria, Ed. UFSM, 2004.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M., Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá´ (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, n 253, p. 317– 321, 2006.

BARRETO, R.E.; VOLPATO, G. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. **Behavioural Process**, v. 66, p. 43-51 , 2004.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. In: Iwama, G.Ket al. (Eds.), **Fish Stress and Health in Aquaculture**, Cambridge: Univ. Press. 1997, p. 1 – 33, (Society for Experimental Biology Seminar Series 62).

BARTON, B.A. Stress. In: Stickney, R.R. (Ed.), **Encyclopedia of Aquaculture**. John Wiley and Sons, 2000, p. 892–898.

BERKA, R. **The transport of live fish: a review**. Rome, United Nations, 1986, 52 p. (FAO Report. EIFAC Technical Paper 48).

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne, 1991. 247 p.

BURKA, J.F.; et al. Drugs in salmonid aquaculture review. **J. Vet. Pharmacol.** n. 20, p. 333–349. 1997.

CHAIBI, A.; et al. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. **Food Microbiology**, v. 14, p. 161-174, 1997.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of American society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 458-462. 1990.

CHO, G.K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquac. Res.** n. 31, p. 537–546, 2000.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 4.

CRUZ, G.L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. 5. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995. 599 p.

DAVIDSON, G.W.; et al. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui-Sk. **J. World Aquac. Soc.** V. 31 n. 1, p. 105– 114, 2000.

DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R.; GRAY, W.L. Effect of dietary cortisol on resistance of channel catfish to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus disease. **Aquaculture** n. 218, p.121– 130, 2003.

DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebentifolius* raddi. **Revista Ciência Agrotecnica Lavras**, v 29, n.3, p. 617-622 , 2005.

FLACH, A.; et al. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Medica** n. 68, p. 836-838, 2002.

IWAMA, G.; et al. **Fish Stress and Health in Aquaculture**. Cambridge: University Press, 1997. 432 p.

IWAMA, G.; et al. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.

GILDERHUS, P.A.; MARKING, L.L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage.** v. 7, p. 288– 292, 1987.

GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -, Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, 1980.

KISMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 199, 1608 p.

LAGUNES T.A.; RODRIGUEZ, H.C., **Busqueda de Tecnologia Apropriada para el combate de plagas maiz almacenado em condiciones Rusticas**. Champingo: CONACYT-CP, 1989. 150 p.

LANZILLOTTI, R.S.; LANZILLOTTI, H.S. Sensorial analysis under the focus of fuzzy logic. **Rev. Nutr**, v. 12, n.2, p. 145-157, 1999.

MORAES, M.A.C.M. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas : UNICAMP, 1993, 93 p. (Série Manuais).

MOREL, A.F.; et al. **Phytochemistry**, v. 61, p. 561-566, 2002.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**: Doenças, aplicações, Descrição e propriedade. São Paulo, Hemus, 1994, 555 p.

MARQUESINI, N.R. Dissertação de mestrado em: Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá. Universidade Federal do Paraná, 290p. Curitiba, 1995.

OYEDEJI, A. O.; et al. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Science Direct-Fitoterapia**, v. 70, p. 526-528, 1999.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals** 2nd ed. London: Blackwell, 1999.

SCORVO-FILHO, J.D. **Panorama da Aqüicultura Nacional**, 2002. Capturado em 01 out 2006. Online disponível na internet:
www.acaq.org.br/arquivos/Panorama_da_aquicultura_nacional.PDF

SEIGNEUR, G.N. Eficacia del Ms-222, quinaldina y benzocaina como anestésicos em *Rhamdia sapo*. **Mems Asoc. Latinam. Aquicult**, v. 5, n. 3, p.633-639, 1984.

SILVA, J., et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 89, p. 277-283, 2003.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156 p. (PhD Thesis) - Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996. Stockholm, Sweden.

SLADKY, K.K., et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachpomus*). **Am. J. Vet. Res.** V. 62, p. 337– 342, 2001.

SMALL, B.C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.

SOTO, C.G.; BURNANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture** n. 135, p. 149–152, 1995.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anaesthesia, surgery and related techniques, in Schrek, C.B., Moyle, P.B. methods for fish biology, capitulo 8, **American Fishery Society**, n. 684 p., 2000.

WAGER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture** n. 211, p.353–366, 2003.

WATTS B.M., et al. **Métodos sensoriais básicos para la evaluación de alimentos**. Traducción: Oficina de Traducciones, Secretaria de Estado. Ottawa : Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. 1992, 170 p.

ZARATE, J.; BRADLEY. T. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture**, v. 223, p. 175 -187, 2003.