

Comparação da eficácia do fenoxietanol e do óleo de cravinho como anestésicos no cultivo de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*)



Marisa Isabel Jesus Barata

2015



Comparação da eficácia do fenoxietanol e do óleo de cravinho como anestésicos no cultivo de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*)

Marisa Isabel Jesus Barata

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação de:

Orientadora interna - Especialista Teresa Baptista

Orientadora externa - Doutora Laura Ribeiro

2015

Comparação da eficácia do fenoxietanol e do óleo de cravinho como anestésicos no cultivo de juvenis de corvina (Argyrosomus regius)

Copyright de Marisa Isabel de Jesus Barata, da ESTM e do IPL. A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo projeto AQUACOR – Projeto-piloto de cultivo de corvina em vários sistemas de produção (PROMAR 31-03-05FEP-003), do qual sou bolsista de Investigação.

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de um grupo de pessoas às quais gostaria de agradecer:

Ao Dr. Pedro Pousão, por permitir a realização deste trabalho na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Agradeço a sua disponibilidade e apoio na realização deste trabalho, bem como o incentivo na realização deste mestrado.

À Doutora Laura Ribeiro, minha orientadora, pelo incentivo e motivação que sempre me deu para a realização deste trabalho. Pela transmissão de conhecimentos e esclarecimentos de dúvidas. Por acreditar em mim e nas minhas capacidades, pela paciência e pela disponibilidade que sempre demonstrou. Agradeço também a sua amizade que tornou tudo muito mais fácil, enfim, agradecer-lhe será sempre pouco.

À Especialista Teresa Baptista, por ter aceitado ser minha orientadora e por me ter ajudado sempre, em tudo o que precisei para chegar até aqui.

À Doutora Florbela Soares, pela ajuda fundamental na parte prática do trabalho e pela motivação que sempre me deu para terminar esta etapa.

Aos meus pais e restante família que sempre me apoiaram e motivaram para que nunca desistisse.

Ao Francisco, pelo apoio e paciência neste ano de tanto trabalho.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia dos anestésicos, fenoxietanol e óleo de cravinho no manuseamento de juvenis de corvina, *Argyrosomus regius*. Foram realizados ensaios com juvenis para determinar: a dose adequada de anestesia para diferentes procedimentos em aquacultura, como a avaliação do crescimento, triagens, transportes, recolha de sangue; para analisar se baixas concentrações de anestesia induzem a sedação ou se têm um efeito de stress; e se o comportamento e a sobrevivência dos peixes são afetados quando mantidos em baixas concentrações dos anestésicos, por longos períodos de tempo e em densidades elevadas.

Os juvenis de corvina utilizados neste estudo eram saudáveis, em relação à sua atividade e aparência exterior. Os juvenis foram selecionados com base no seu peso (135 ± 5 g) e foram aclimatados e mantidos num tanque em um sistema aberto durante uma semana. Durante este período, os parâmetros da água foram registados diariamente e os peixes foram alimentados até a saciedade duas vezes por dia com uma ração comercial. Antes de cada experiência, os juvenis foram mantidos em jejum durante 24 horas.

Os anestésicos foram testados a diferentes concentrações: 100, 250, 400, 550 e 700 mg/L de fenoxietanol e 25, 40, 55, 70 e 85 mg/L de óleo de cravinho. Os juvenis foram anestesiados em menos de 10 minutos com concentrações acima de 250 mg/L de fenoxietanol e acima de 40 mg/L de óleo de cravinho. A anestesia profunda só foi atingida com as concentrações de 700 mg/L de fenoxietanol e 85 mg/L de óleo de cravinho. Com estas concentrações não se verificou nenhuma reação do peixe à picada na simulação de recolha de sangue. Os níveis de cortisol e glucose plasmática foram semelhantes entre as corvinas sedadas com baixas concentrações de anestésicos (100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho) e com grupo em que não foi utilizada anestesia ($P > 0,05$). Isto sugere que baixas concentrações de anestesia induzem respostas ao stress idênticas ao manuseio em atividades rotineiras. Quando a

corvina foi mantida durante 2 horas, a altas densidades e com baixas concentrações de cada um dos anestésicos, a sobrevivência foi de 100%.

Palavras-chave: anestésicos; corvina; rotinas de aquacultura; comportamento; cortisol; glucose.

Abstract

The efficiency of two anaesthetics, phenoxyethanol and clove oil for handling meagre, *Argyrosomus regius*, was assessed in this study. Trials were conducted on juveniles: to determine the adequate dose of anaesthesia for different aquaculture procedures like growth assessment, sorting, transportation, blood collection; to analyse if low concentrations of anaesthetic induced sedation or had a stressor effect; and if fish behaviour and survival were affected when maintained at low anaesthetic concentrations for long periods at high fish densities.

Meagre juveniles used in this study were healthy, regarding their activity and exterior appearance. The juveniles were sorted on weight basis (135 ± 5 g) and maintained in a tank in a flow-through system for a week, to acclimate. During this period, water parameters were registered on a daily basis and the fishes were fed to satiety twice a day with a commercial feed. Before each experiment, juveniles were fasted for 24 hours.

Anaesthetics were tested at different concentrations: phenoxyethanol at 100, 250, 400, 550 and 700 mg/L; clove oil at 25, 40, 55, 70 and 85 mg/L. Meagre were anaesthetized before 10 min at concentrations above 250 mg/L for phenoxyethanol and above 40 mg/L for clove oil. Deep anaesthesia were 700 mg/L and 85 mg/L, respectively for phenoxyethanol and clove oil. No fish reaction was observed when fish was punctured to simulate blood collection at was collected these concentrations. Plasmatic cortisol and glucose levels were similar between sedated meagre using low concentrations of anaesthetics (100 mg/L of phenoxyethanol and 10 mg/L of clove oil) and a group where no anaesthetic was used ($P>0.05$). This suggests that low anaesthesia concentrations induce identical stress response as handling in routine activities. Survival of 100% was observed when meagre was maintained with low concentrations of each anaesthetic for 2 h at high densities.

Key words: anaesthetics; meagre; aquaculture routines; behaviour; cortisol; glucose.

Índice de matérias

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.2. A aplicação da anestesia.....	4
2.3. Fatores que influenciam a anestesia	5
2.4. Estádios de anestesia.....	7
2.5. Métodos de utilização	9
2.6. Anestésicos	10
2.6.1. Fenoxietanol.....	13
2.6.2. Óleo de cravinho	13
2.7. Respostas ao stress	14
2.8. Objetivo	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Peixes.....	17
3.2. Anestésicos	17
3.3. Indução e Recuperação de anestesia.....	18
3.4. Concentrações eficazes para procedimentos evasivos.....	19
3.5. Efeitos de pequenas doses de fenoxietanol e óleo de cravinho	20
3.5.1. Efeitos fisiológicos de baixas concentrações de anestésicos.....	20
3.5.2. Efeitos da duração prolongada do anestésico em densidades elevadas usando baixas concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho	22
3.6. Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Indução e Recuperação de anestesia.....	24
4.2. Efeitos de baixas concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho.....	28
5. Discussão	30
6. Considerações Finais	34
7. Investigação futura	34
8. Referências	35

Índice de figuras

Figura 1- Juvenis de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>). Fonte: IPMA	3
Figura 2- Esquema simplificado do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (CRH- hormona libertadora de corticotropina; ACTH- hormona adrenocorticotrópica) Adaptado de Ellis et al. 2012.....	15
Figura 3- Indução de anestesia em juvenis de corvina.....	18
Figura 4- Recolha de sangue na veia caudal em juvenis de corvina.	21
Figura 5- Média (\pm DP) do tempo de indução de anestesia profunda (estádio AIII) e tempo de recuperação (estádio RIII) de juvenis de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>) (n=6) mantidos a 18°C e expostos a diferentes concentrações de fenoxietanol.	25
Figura 6- Média (\pm DP) do tempo de indução para a anestesia profunda (estádio AIII) e tempo de recuperação (estádio RIII) de juvenis de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>) (n=6) mantidos a 18°C e expostos a diferentes concentrações de óleo de cravinho.	27
Figura 7- Concentrações de cortisol plasmático na corvina, <i>Argyrosomus regius</i> , manipulada para amostragem biológica com baixas concentrações de anestesia (100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho, mantidas durante 30 minutos em água limpa antes da recolha de sangue. O grupo controlo foi submetido ao mesmo procedimento mas sem a utilização de anestesia. Os valores são apresentados em médias \pm desvio padrão, n=6.....	28
Figura 8- Concentrações de glucose na corvina, <i>Argyrosomus regius</i> , manipulada para amostragem biológica com baixas concentrações de anestesia (100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho, mantidas durante 30 minutos em água limpa antes da recolha de sangue. O grupo controlo foi submetido ao mesmo procedimento mas sem a utilização de anestesia. Os valores são apresentados em médias \pm desvio padrão, n=6.	29

Índice de tabelas

Tabela 1- Estádios de anestesia e de recuperação descritos por Iwama et al. (1989) para a truta arco-íris (<i>Salmo gairdneri</i>).	7
Tabela 2- Estádios de anestesia descritos por Summerfelt e Smith (1990).....	8
Tabela 3- Concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho utilizadas na indução do estágio AIII de anestesia em diferentes espécies de peixes.	11
Tabela 4- Tempo de indução (minutos) para a anestesia profunda (AIII) e tempo de recuperação (RIII) de juvenis de corvina, <i>Argyrosomus regius</i> , expostos a diferentes concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho a 18°C. Os valores são apresentados em média ± desvio padrão, n=6. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre tratamentos para P< 0.05.	26

Abreviaturas

ACTH- hormona adrenocorticotrópica

ATP- adenosina trifosfato

CRH- hormona libertadora de corticotropina

EPPO- Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EUA- Estados Unidos da América

FDA- Food and Drugs Administration

GABA_A- receptor ácido gama-amino butírico do tipo A

HK - hequinase

IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LMR- limites máximos residuais

MS222- metanosulfonato de tricáína

NDA- nicotinamida adenina dinucleótido

NMDA- neuroreceptor N-metil-D-aspartato

1. Introdução

Nas últimas décadas, a aquacultura tem-se expandido, intensificado e diversificado mundialmente, em resposta a um aumento da procura de peixe como fonte de proteína (Gabriel e Akinrotimi 2011). Com o aumento da população mundial, o consumo de peixe *per capita* aumentou e com a estabilização das capturas de pescado, a aquacultura torna-se cada vez mais uma alternativa de abastecimento de pescado (FAO 2014).

Talvez devido a esta rápida expansão da aquacultura, o bem-estar dos peixes em cativeiro tem adquirido uma maior preocupação (Lawrence 2008; Ross e Ross 2008; Ellis et al. 2012). Para além de ser uma questão importante para a indústria, na perspetiva da perceção pública, do marketing e da aceitação do produto, também é relevante em termos de eficiência de produção, qualidade e quantidade (Ashley 2007).

Todas as atividades que implicam a manutenção de peixes vivos, como estabelecimentos de aquacultura, centros de investigação ou centros de animais, requerem algumas práticas regulares de manuseamento dos peixes. Nestas atividades estão incluídas amostragens biológicas, triagens, vacinação, transporte, entre outros. Estes procedimentos são frequentes, podendo causar grandes períodos de stress, tendo um impacto negativo no crescimento e na saúde dos peixes (Perdikaris et al. 2010). Neste contexto, o uso de anestésicos é uma ferramenta útil pois não só ajuda a impedir danos físicos nos peixes e nos operadores, como atenua o stress durante os processos de manipulação e facilita o seu manuseamento (Ross and Ross 2008).

Os anestésicos tradicionalmente usados em peixes são o metanosulfonato de triclaína (MS222), o fenoxietanol, a benzocaína, a quinaldina bem como o metomidato (Mylonas et al. 2005; Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009; Perdikaris et al. 2010; Zahl et al. 2012). O óleo de cravinho, bem como os seus derivados (Aqui S ®) tem sido considerado um anestésico interessante para peixes, por se tratar de um produto natural (Perdikaris et al. 2010).

A seleção de um anestésico requer um número de considerações importantes, tais como a eficácia, o custo, a disponibilidade e facilidade de uso, bem como a toxicidade para os peixes, para os seres humanos e para o ambiente (Soto e Burhanuddin 1995). Esta seleção pode também depender de fatores ambientais como a temperatura e o pH e fatores biológicos como a espécie ou o peso dos peixes. Assim, para a maioria das espécies produzidas em aquacultura já existem protocolos desenvolvidos por vários investigadores (King et al. 2005; Mylonas et al. 2005; Tsantillas

et al. 2006; Weber et al. 2009; Serezli et al. 2011; Shalvei et al. 2012; Öğretmen e Gökçek 2013)

A corvina, *Argyrosomus regius*, tem sido apontada como uma espécie com interesse crescente para a aquacultura, por apresentar taxas de crescimento elevadas e uma boa aceitação por parte do consumidor (Ribeiro et al. 2015). Na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), bem como em outras instituições de investigação em aquacultura, a corvina tem sido objeto de estudo, verificando-se algumas diferenças no seu comportamento, relativamente a outras espécies habitualmente produzidas em cativeiro (ex: robalo, dourada e sargo). Uma das diferenças refere-se à eficácia dos anestésicos. Na EPPO, durante os procedimentos de rotina tem-se verificado que a esta espécie se torna um pouco agitada quando anestesiada com baixas concentrações de fenoxietanol (100mg/L), dando a entender que o anestésico atua como um fator de stress. Esta hipótese já foi demonstrada em alguns estudos em que os anestésicos também podem atuar com agentes de stress ao invés de atuarem com sedativos (Õrtuno et al. 2002).

Apesar do potencial da corvina para a produção em aquacultura, são escassos os estudos sobre as condições de anestesia em situações de manejo, quer para aquacultura quer para procedimentos de investigação. Até à data apenas se conhece um trabalho sobre a eficácia do fenoxietanol em juvenis de corvina com cerca de 1g (Serezli et al. 2011). Assim é importante obter um maior conhecimento sobre a eficácia de diferentes anestésicos para esta espécie.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A corvina

A corvina, *Argyrosomus regius*, pertencente à família Sciaenidae, encontra-se distribuída desde a Noruega até ao Senegal ao longo da costa Atlântica, incluindo o Mar Mediterrâneo e o Mar Negro (Poli et al. 2003). Sendo uma espécie semi-pelágica, pode ser facilmente encontrada em águas costeiras de fundos rochosos e campos de *Posidonia*, a profundidades entre os 15 e os 200 m (Cárdenas 2010).



Figura 1- Juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*). Fonte: IPMA

O cultivo de corvina iniciou-se em França e em Itália no final dos anos 90 e tem-se desenvolvido em alguns países do Sul da Europa, tendo-se verificado um aumento da sua produção em 2010, surgindo como uma nova espécie aquícola no mercado (Monfort 2010). São várias as características de cultivo que levaram ao aumento da sua produção, das quais se destacam a fácil aclimação de reprodutores, o que permite a obtenção de ovos de qualidade, o cultivo larvar relativamente fácil com alimento vivo industrial e dietas formuladas, os juvenis não apresentam a maturação sexual durante a fase de engorda, crescem rápido e podem atingir boas taxas de conversão alimentar (Duncan et al. 2013). Atualmente, a maior produção de corvina verifica-se em países como Espanha, França, Itália, e Turquia (FEAP 2015).

A corvina tem sido alvo de vários estudos por parte de diversos centros de investigação e universidades, onde as linhas de pesquisa abrangem várias áreas como a reprodução (Duncan et al. 2008; Mylonas et al. 2013), o cultivo larvar (Roo et al. 2010), o crescimento e a nutrição (Chatzifotis et al. 2010, 2012; Ribeiro et al. 2015) e as doenças (Soares et al. 2012). No entanto, estudos sobre o uso de anestésicos com esta espécie são reduzidos, aumentando assim a importância deste trabalho.

2.2. A aplicação da anestesia

A palavra anestesia provém de uma derivação grega, que significa perda de sensibilidade (Ross e Ross 2008; Zahl et al. 2012). No geral, a anestesia tem sido descrita como um estado causado por um agente externo, que resulta na perda de sensibilidade através da depressão do sistema nervoso (Iwama e Ackerman 1994).

A anestesia tem sido utilizada em peixes, desde o início do século passado. A aplicação desta metodologia deriva em grande parte da medicina humana e veterinária e foi introduzida nos peixes por tentativa e erro (Ross e Ross 2008; Zahl et al. 2012). Inicialmente, os anestésicos eram utilizados apenas para facilitar o manuseamento, mas com o melhor conhecimento fisiológico dos peixes e uma maior preocupação em manter o bem-estar animal, o âmbito de aplicação dos anestésicos tem sido alargado. Em aquacultura, o uso de anestésicos é hoje utilizado frequentemente para minimizar o stress provocado pelos procedimentos inerentes a esta atividade, como o transporte, amostragens biológicas (peso e comprimento), triagens, seleção, vacinação, recolha de sangue, marcações eletrónicas, entre outras (Cooke et al. 2004; Mylonas et al. 2005; Weber et al. 2009).

Dependendo do objetivo que se pretende, um anestésico pode induzir vários estados, como a sedação, a anestesia profunda e a morte (Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008). Em termos gerais, a sedação é um estado preliminar de anestesia onde ocorre uma redução da sensibilidade, mas em que não há nenhuma perda de percepção sensorial ou de equilíbrio (Ross e Ross 2008). A anestesia profunda pode ser definida como uma perda generalizada da percepção sensorial e de memória, mas também de imobilização e alívio de dor (Zahl et al. 2012). A sobredosagem de um anestésico provoca a morte do animal e é considerada como um método aceitável de eutanásia (Neiffer e Stamper 2009)

A finalidade do uso de anestésicos foca-se na redução da mobilidade dos peixes tornando possível a realização de vários procedimentos. Mas não só, os anestésicos são também utilizados para diminuir a intensidade do stress e a ocorrência de danos físicos e, desta forma, proteger as funções vitais e fisiológicas dos peixes (Cooke 2004). No entanto, sabe-se que a anestesia em peixes pode também constituir um agente de stress (Iwama et al. 1989). Por esta razão, a determinação das concentrações apropriadas de anestésico em função das características dos peixes e das condições ambientais onde estes se encontram é de extrema importância.

Os locais de ação dos anestésicos no sistema nervoso central ou periférico não são muito conhecidos nos peixes, e a maior parte do conhecimento advém dos vertebrados, especialmente de mamíferos (Zahl et al. 2012). Normalmente, os procedimentos de anestesia profunda atuam através de uma depressão generalizada do sistema nervoso central, produzida por ação nos axónios através da libertação de neurotransmissores ou por alteração na permeabilidade da membrana, ou por combinação destas duas ações (Ross e Ross 2008). A libertação de neurotransmissores GABA e alterações nos canais de sódio, potássio e cálcio são os mais referenciados na utilização de anestésicos.

2.3. Fatores que influenciam a anestesia

A eficácia dos anestésicos pode variar não só entre diferentes espécies mas também dentro da mesma espécie. Os fatores biológicos como a idade, o peso, a percentagem de gordura corporal, a estado de saúde ou mesmo a área da superfície branquial, fazem com que os peixes respondam de forma diferente a uma determinada dose de anestesia (Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008; Zahl et al. 2012). Essa resposta pode ainda ser influenciada por fatores ambientais, como a temperatura, o pH, a salinidade e o oxigénio dissolvido (Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008; Zahl et al. 2009; Zahl et al. 2012; Ghanawi et al. 2013).

A importância do peso do peixe na resposta a um anestésico nem sempre é clara (Tsantilas et al. 2006; Zahl et al. 2009; Perdikaris et al. 2010). Alguns estudos mostram que não existe nenhuma relação entre o peso e os tempos de indução e recuperação de anestesia (Weyl et al. 1996; Zahl et al. 2012), enquanto outros mostram que essa relação existe (Tsantilas et al. 2006; Zahl et al. 2009; Perdikaris et al. 2010). Perdikaris et al. (2010) verificaram que, para o peixe-dourado (*Carassius auratus*), o tempo de indução de anestesia com óleo de cravinho está relacionado com o peso, onde os peixes maiores necessitavam de tempos de indução de anestesia maiores. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Zahl et al. (2009), que demonstraram que com o aumento do peso do bacalhau do Atlântico se verificou um aumento nos tempos de indução e de recuperação para o MS222 e a benzocaína. Ambos os autores justificam esta relação, afirmando que a taxa de absorção do anestésico através das brânquias nos peixes menores é superior, em comparação com os peixes maiores. Mais ainda, Zahl et al. (2009) sugerem que uma taxa de absorção mais lenta pode estar relacionada com o metabolismo basal, que é menor em peixes grandes, verificando-se assim, um menor consumo de oxigénio, em relação ao tamanho do corpo dos peixes.

Pode ainda verificar-se o caso de peixes maiores apresentarem tempos de indução e recuperação menores (Coyle et al. 2004). Este facto pode estar relacionado com a atividade do peixe, onde um peixe mais ativo absorve mais rapidamente o anestésico do que um peixe sedentário.

Zahl et al. (2009) demonstraram que com o aumento do peso do bacalhau do Atlântico não se verificam diferenças significativas nos tempos de indução e recuperação para o metomidate e o fenoxietanol. Isto demonstra que a eficácia da anestesia também depende do tipo de anestésico que se utiliza.

Os animais doentes ou debilitados são muito mais suscetíveis à utilização de um anestésico (Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008), assim é muito importante que a determinação da eficácia dos anestésicos seja efetuada em peixes saudáveis.

Em termos ambientais, a temperatura é o fator que mais se destaca na eficácia dos anestésicos, principalmente pela sua importância na determinação da taxa de processos fisiológicos em animais, sobretudo em espécies ectotérmicos como os peixes. Assim este parâmetro desempenha um papel importante nos processos relacionados com a absorção e eliminação da anestesia (Zahl et al, 2012). Com os anestésicos MS222, benzocaína e fenoxietanol são necessárias doses mais elevadas ou tempos de exposição mais longos quando a água apresenta temperaturas mais baixas, pois a taxa de absorção possivelmente diminui com a temperatura (Coyle et al. 2004). Estudos realizados por Mylonas et al. (2005) com robalo e dourada, demonstraram que à temperatura de 25°C a concentração ideal de anestésico era mais baixa do que à temperatura de 15°C. Tal facto pode ter ocorrido porque as temperaturas mais elevadas fazem aumentar o metabolismo e a ventilação opercular nos peixes (Mylonas et al. 2005). De igual modo, com temperaturas mais baixas a ventilação opercular será menor e resultará em tempos de indução mais prolongados.

O pH de uma solução anestésica também pode influenciar a sua eficácia, possivelmente afetando a relação de moléculas carregadas para não carregadas (Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009). Geralmente, a diminuição do pH diminui a eficácia do anestésico, porque o aumento de ionização interfere com a absorção. Isso é mais pronunciado com a quinaldina, que perde a sua eficácia em soluções com pH baixo. Alguns anestésicos são mais ácidos e requerem uma solução tampão para neutralizar o pH. Mas em água salgada em que pH é mais elevado, verifica-se uma maior capacidade de tamponamento natural, em comparação com a água doce, podendo não ser necessária a adição de agentes tampão (Neiffer e Stamper 2009).

2.4. Estádios de anestesia

A exposição dos peixes a vários anestésicos causa diferentes respostas de acordo com a espécie em estudo, como fatores biológicos e ambientais (temperatura, pH) e com as concentrações utilizadas. Estas respostas apresentam, normalmente, uma sequência progressiva de comportamentos. Alguns autores caracterizaram estas respostas, desenvolvendo diferentes escalas ou estádios de anestesia (Iwama et al. 1989; Summerfelt e Smith 1990) e muitos outros adaptam os estádios já desenvolvidos para a espécie em estudo e as condições físico-químicas que têm disponíveis (King et al. 2005, Akbulut et al. 2012; Öğretmen e Gökçek 2013).

Os estádios descritos por Iwama et al. (1989), e Summerfelt and Smith (1990) são normalmente os mais utilizados nos estudos com anestésicos em peixes (Keene et al. 1998; Cooke et al. 2004; Mylonas et al. 2005; Tsantilas et al. 2006; Weber et al. 2009; Ucar e Atamanalp 2010). De uma forma geral, Iwama et al. (1989) descreve as respostas comportamentais dos peixes em três estádios de indução da anestesia e da recuperação dos peixes (Tabela 1).

Tabela 1- Estádios de anestesia e de recuperação descritos por Iwama et al. (1989) para a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*).

Estádio	Anestesia
I	Perda de equilíbrio
II	Perda da maior parte dos movimentos corporais, mas com movimentos operculares regulares
III	Deposição no fundo do aquário com cessação dos movimentos operculares
Recuperação	
I	Corpo imóvel. Retornam os movimentos operculares
II	Movimentos operculares regulares, início de movimento corporal
III	Recuperação do equilíbrio e natação e aparência pré-anestésica

Summerfelt e Smith (1990) descrevem as respostas dos peixes aos anestésicos em seis estádios de indução de anestesia (Tabela 2).

Tabela 2- Estádios de anestesia descritos por Summerfelt e Smith (1990).

Estádio de anestesia	Descrição	Características
0	Normal	Reação a estímulos externos, movimentos operculares normais.
1	Sedação leve	Ligeira perda de reação a estímulos externos; diminuição ligeira dos movimentos operculares; equilíbrio normal.
2	Sedação profunda	Perda total da reação a todos os estímulos externos; ligeira queda na taxa de respiração; equilíbrio normal.
3	Perda parcial de equilíbrio	Perda parcial do tônus muscular; natação errática, maior taxa de respiração; reação apenas a fortes estímulos táteis e vibratórios.
4	Perda total de equilíbrio	Perda total perda de tônus muscular e do equilíbrio; movimentos operculares lentos, mas regulares; perda dos reflexos espinhais.
5	Perda de reflexos	Perda total da reação; movimentos operculares lentos e irregulares; ritmo do coração muito lento; perda de todos os reflexos.
6	Colapso da medula	Cessam os movimentos operculares; paragem cardíaca.

O progresso da indução e recuperação da anestesia são geralmente divididos em diferentes estádios. Nos animais terrestres, os indicadores clínicos habitualmente utilizados para avaliar as diferentes fases de anestesia incluem o comportamento, a atividade, os reflexos da córnea e o tamanho da pupila, o tônus muscular, os reflexos, a frequência respiratória, a frequência cardíaca e pressão arterial (Zahl et al. 2012). Como a maior parte destes indicadores são difíceis de avaliar nos peixes, pode ser difícil distinguir um estágio de outro, especialmente em situações em que a indução decorre rapidamente. Nos peixes, os estádios de indução e recuperação são geralmente

descritos por mudanças na atividade de natação, no equilíbrio, na frequência respiratória e nas reações a estímulos externos (Neiffer e Stamper 2009; Zahl et al. 2012). Mas, dependendo da espécie, do anestésico e da concentração utilizada alguns destes componentes podem não ser visíveis (Neiffer e Stamper 2009).

2.5. Métodos de utilização

A metodologia mais utilizada para a administração de anestésicos em peixes é o banho de imersão (Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009). O procedimento é bastante simples, e consiste em dissolver a quantidade de anestésico na água para se obter a concentração desejada. Após a indução do estágio de anestesia pretendida, a intervenção ao peixe pode ser efetuada, sendo este depois transferido para um tanque com água limpa onde irá recuperar. A água usada nos tanques do anestésico e da recuperação deve ter os parâmetros físico-químicos idênticos aos da água do tanque de origem dos animais (Ross e Ross 2008). Esta água deve ser trocada com frequência para garantir a concentração de anestesia desejada. Durante a fase de recuperação a água também deve ser renovada com frequência, de modo a evitar a reabsorção dos metabolitos excretados pelos peixes anestesiados.

A absorção do anestésico no peixe ocorre através das brânquias e/ou da pele. O peixe ventila a solução de anestésico que entra na corrente sanguínea e chega rapidamente ao sistema nervoso central. Tanto o tecido branquial como a pele contêm grande quantidade de lípidos, de tal forma que a eficiência de absorção do anestésico ao longo destas superfícies está diretamente relacionada com a solubilidade lipídica do químico (Neiffer e Stamper 2009).

Para além do método de imersão, os peixes podem ainda ser anestesiados por injeção via intramuscular, intravascular ou intraperitoneal, a designada anestesia local (Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009). Esta técnica não sendo prática, não é habitualmente utilizada nas rotinas diárias de aquacultura. No entanto, pode ser utilizada em laboratórios científicos para a prática de cirurgias e combinação com o método de imersão. Ainda menos frequente é a anestesia oral, onde o anestésico é incorporado na dieta (Ross e Ross 2008). Este método apresenta alguns problemas que incluem os aspetos técnicos da absorção do anestésico de maneira uniforme na dieta. Além disso, a indução tende a ser lenta, pois a droga é absorvida através do intestino e não é possível prever com precisão a quantidade consumida pelos peixes.

2.6. Anestésicos

A manipulação de peixes em aquacultura e/ou laboratórios de investigação exige, em certo tipo de procedimentos, que se recorra à sedação ou anestesia dos animais. Para tal, existe uma diversidade de anestésicos que permitem a sua realização. Os produtos utilizados para sedar ou anestésiar peixes, podem ser divididos em duas categorias, sendo eles os anestésicos químicos e os não químicos (Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009).

Os anestésicos químicos mais utilizados em peixes são o metanosulfonato de triclaína (MS222), a benzocaína, o fenoxietanol, o óleo de cravinho, o metomidato e a quinaldina (Kreiberg 2000; Coyle et al. 2004; Ross e Ross 2008; Neiffer e Stamper 2009; Zahl et al. 2012, Readman et al. 2013).

O MS222 é o anestésico mais utilizado em peixes pelo facto de ser o único aprovado pela FDA nos EUA e por ser um dos anestésicos aprovados pela União Europeia. Seguidamente surge o fenoxietanol e o óleo de cravinho, como anestésicos mais utilizados não só em aquacultura mas em diversos estudos científicos, como pode ser comprovado na tabela 3. Segundo, Readman et al. (2013) o fenoxietanol é utilizado em procedimentos de rotina na Europa continental e óleo de cravinho têm vindo a ser cada vez mais utilizado por se tratar de um anestésico de origem natural, pela sua disponibilidade no mercado e pelo seu baixo custo.

A benzocaína é quimicamente muito similar ao MS222, embora o seu preço seja muito mais barato, é geralmente usada para eutanasiar peixes por causar uma indução rápida (Readman et al. 2013). O metomidato é usado para sedação e anestesia em alguns procedimentos mas não induz anestesia profunda (Neiffer e Stamper 2009). A quinaldina, devido também ao seu baixo custo, tornou-se popular na captura de peixes do meio selvagem e é utilizado em pequenas cirurgias (Ross e Ross 2008).

Tabela 3- Concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho utilizadas na indução do estágio AIII de anestesia em diferentes espécies de peixes.

Nome Comum	Espécie	Peso (g)	Temperatura (°C)	Óleo de cravinho	Fenoxietanol	Referência
Dourada	<i>Sparus aurata</i>	41.9 ± 2.6	25	40(mg/L)	300(mg/L)	Mylonas et al. 2005
Dourada	<i>Sparus aurata</i>	72.1 ± 1.3	15	55(mg/L)	450(mg/L)	Mylonas et al. 2005
Robalo	<i>Dicentrarchus labrax</i>	32.5 ± 1.2	25	40(mg/L)	350(mg/L)	Mylonas et al. 2005
Robalo	<i>Dicentrarchus labrax</i>	44.6 ± 0.1	15	30(mg/L)	300(mg/L)	Mylonas et al. 2005
Sargo comum	<i>Diplodus sargus</i>	30 ± 1.4	20±1		0.167 (mL/L)	Tsantilas et al. 2006
Sargo comum	<i>Diplodus sargus</i>	60 ± 1.7	20±1		0.167 (mL/L)	Tsantilas et al. 2006
Sargo-bicudo	<i>Diplodus puntazzo</i>	15 ± 1.2	20±1		0.167 (mL/L)	Tsantilas et al. 2006
Sargo-bicudo	<i>Diplodus puntazzo</i>	30 ± 1.5	20±1		0.167 (mL/L)	Tsantilas et al. 2006
Linguado	<i>Solea senegalensis</i>	99 ± 2.5	14±1	40(mg/L)	600(mg/L)	Weber et al. 2009
Corvina	<i>Argyrosomus regius</i>	1.3 ± 0.03	20±1		0.3 (mL/L)	Serezli et al. 2011
Corvina	<i>Argyrosomus regius</i>	135 ± 5	18±0.5	85(mg/L)	700(mg/L)	Este estudo
Truta Arco-íris	<i>Salmo gairdneri</i>	391 ± 30.3	10		0.2(mL/L)	Iwama et al. 1989
Esturjão branco	<i>Huso huso</i>	198.35 ± 11.26	19±1		0.7 (mL./L)	Shaluei et al. 2012

Sendo os anestésicos produtos químicos, o seu uso está sujeito a regras de utilização que se baseiam no bem-estar animal, na proteção dos utilizadores e do ambiente e na proteção dos consumidores, quando o peixe se destina ao consumo humano (Ross e Ross 2008). Em Portugal, não existe nenhum tipo de legislação referente ao uso de anestésico em aquacultura. Desta forma, deverá ser aplicada a legislação existente para os países da União Europeia.

A legislação europeia sobre produtos farmacêuticos veterinários tem evoluído no sentido de restrições importantes no uso de medicamentos para o tratamento de animais destinados à alimentação humana. De tal forma que foi criado um regulamento para o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR), o Regulamento (CEE) Nº 2377/90 do Conselho de 26 de Junho de 1990.

Atualmente, em muitos países europeus, não existe nenhum anestésico registado para peixes. Os únicos compostos que têm LMR fixados na União Europeia são a benzocaína e metanosulfonato de tricaína (MS 222, Finquel®). Outros anestésicos, como o fenoxietanol, sulfato de quinaldina e metomidate não têm nenhum LRM fixado mas têm sido largamente utilizados pela comunidade científica.

O óleo de cravinho, que contém cerca de 82 a 87% do eugenol, tem sido descrito como um agente anestésico muito promissor em termos de segurança, de proteção do ambiente, de eficácia em diversos salmonídeos e outras espécies marinhas. Um produto comercial que contém eugenol, AQUI-S®, ganhou aprovação na Nova Zelândia, Austrália e Chile. De acordo com a FDA, nos Estados Unidos, os ingredientes constituintes do óleo de cravinho são considerados seguros para a sua utilização na indústria alimentar e em produtos dentários, mas nenhum deles foi aprovado, até agora, para anestesia de peixes (Perdikaris et al. 2010) devido às preocupações existentes sobre a toxicidade para os peixes e para os seres humanos que consomem esses peixes.

Os anestésicos não químicos não são usados com tanta frequência mas ainda assim também são uma possibilidade em aquacultura, sendo eles a eletro-anestesia, a hipotermia e o dióxido de carbono (Coyle et al. 2004; Kreiberg 2000; Ross e Ross 2008).

Devido à diversidade de anestésicos e às suas características, a seleção de um anestésico deve ter em conta vários fatores. A toxicidade é um dos fatores mais importantes, pois afeta a segurança do operador, do peixe e do ambiente, e desta forma, o anestésico não deve ser tóxico. A redução do stress e a imobilização do peixe são os

principais objetivos aquando da utilização do anestésico, assim, este deve ser eficaz, provocando o estado de anestesia pretendido. Para além disso, a substância deve ser estável e ter uma elevada solubilidade em água doce e/ou salgada ou num solvente solúvel em água. Economicamente, o produto e o seu solvente devem ser de baixo custo e devem estar disponíveis comercialmente (King et al. 2005; Ross e Ross 2008; Akbulut et al. 2012; Ghanawi et al. 2013).

De acordo com Ross e Ross (2008), a anestesia ou sedação deve ser induzida rapidamente, de preferência em menos de 3 minutos, e com o mínimo de hiperatividade ou outras formas de stress. A recuperação deve ser rápida, praticamente completa após cerca de 5 minutos em água limpa, e sem complicações, sem ataxia prolongada ou outras características indesejáveis. O anestésico ideal deve ser fácil de administrar e não deve envolver procedimentos complexos.

2.6.1. Fenoxietanol

O fenoxietanol (ethylene glycol monophenyl ether) é um anestésico sintético, produzido num reator contínuo onde se procede à reação de fenol com o óxido de etileno num meio alcalino. Desta reação resulta um líquido oleoso incolor, transparente ou cor de palha com um ligeiro odor aromático (Ross e Ross 2008; Ucar e Atamanalp 2010; Shalwei et al. 2012). Este produto é moderadamente solúvel em água (27 g/L a 20°C) mas dissolve-se melhor em etanol e apresenta uma baixa taxa de evaporação. A solução apresenta propriedades bactericidas e fungicidas e por isso é normalmente usado como conservante em vacinas, em produtos dermatológicos e como fixante em perfumes (Zahl et al. 2012). Apesar de não apresentar grandes vantagens em relação a outros anestésicos, é um produto relativamente barato e mantém-se ativo, no estado diluído, durante pelo menos 3 dias (Coyle 2004; King et al. 2005).

2.6.2. Óleo de cravinho

O óleo de cravinho é um óleo essencial extraído das flores, caules e folhas da árvore *Syzygium aromaticum* (i.e. *Eugenia aromaticum*) ou *Eugenia caryophyllata* (Chieb et al. 2007; Ross e Ross 2008; Akbulut et al. 2012). Segundo Chaieb et al. (2007), este óleo é composto por 36 ingredientes, sendo o eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) o seu principal, com cerca de 88.6%, seguido do acetato eugenilo com 5.62% e o β cariofileno com 1.38%. Mas a percentagem de cada ingrediente pode variar dependendo

da genética da planta, do clima, do solo, das técnicas de cultivo, da parte da planta extraída e do método de extração.

Este produto natural encontra-se no estado líquido, apresentando uma cor amarelada ou acastanhada e um forte sabor/odor aromático. As suas aplicações são variadas, sendo usado como anestesia de dentista ou como analgésico para dor de dentes, cabeça e articulações (Soto e Burhanuddin 1995; Chieb et al. 2007; Ross e Ross 2008) e exibe propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas e antivirais (Chieb et al. 2007; Akbulut et al. 2012). O óleo de cravinho é ainda usado como aditivo alimentar, como fragrância e, embora em menor percentagem, na indústria dos detergentes e sabões, bem como na área da cosmética.

O óleo de cravinho tem sido considerado como uma alternativa de anestésicos para peixes, devido sobretudo ao baixo custo e ao facto de não apresentar risco para a saúde humana (Perdikaris et al. 2010; Ucar e Atamanalp 2010).

2.7. Respostas ao stress

Devido ao facto de os peixes serem animais ectotérmicos, estes estão sujeitos a mudanças constantes, principalmente devido aos parâmetros físico-químicos da água. Para além disso, e uma vez inseridos em atividades onde são manuseados, os peixes podem também sofrer de outro tipo de desafios. Assim, os peixes necessitam de encontrar formas de lidar com estas mudanças para garantir a sua sobrevivência. O conjunto de estratégias fisiológicas desencadeadas por mudanças químicas, físicas e biológicas é comumente designado de respostas ao stress (Filiciotto et al. 2012). Estas respostas englobam alterações ao nível comportamental e fisiológico, onde o resultado da interação entre as mudanças no organismo e o fator de stress determina o sucesso ou o fracasso no restabelecimento da homeostasia (Barton 2002).

Embora existam algumas diferenças entre o meio aquático e o meio terrestre, no geral, as respostas ao stress dos peixes são equiparadas com as de outros animais (Huntingford et al. 2006; Ross e Ross 2008). Estas respostas têm sido amplamente classificadas em respostas primária, secundária e terciária (Barton 2002; Ashley 2007; Pottinger 2008; Ross e Ross 2008; Gabriel e Akinrotimi 2011; Ellis et al. 2012).

A resposta primária está associada ao sistema neuroendócrino. A primeira ativação rápida ocorre no sistema nervoso simpático, que induz a libertação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) no sangue a partir do tecido cromafim

(equivalente à medula supra-renal nos humanos). O tecido cromafim está localizado na parte anterior do rim em peixes e é constituído por dois tipos de células que contêm glândulas secretoras (Barton 2002; Ross e Ross 2008). A segunda ativação ocorre no eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, que através de uma cascata de eventos, termina na estimulação do tecido interrenal que sintetiza e liberta os corticosteróides (Figura 2). O cortisol é o principal corticosteróide nos peixes ósseos e o principal indicador de stress (Barton 2002). Níveis elevados de catecolaminas e de cortisol no sangue representam assim, a resposta primária a agentes de stress. (Pottinger 2008).

A síntese e libertação do cortisol no tecido interrenal tem um intervalo de tempo de vários minutos, ao contrário da libertação de catecolaminas pelas células de cromafina (Barton 2002). A avaliação os níveis de cortisol de um peixe que é exposto a um agente de stress envolve a necessidade de determinar os níveis de cortisol uns minutos após o estímulo.

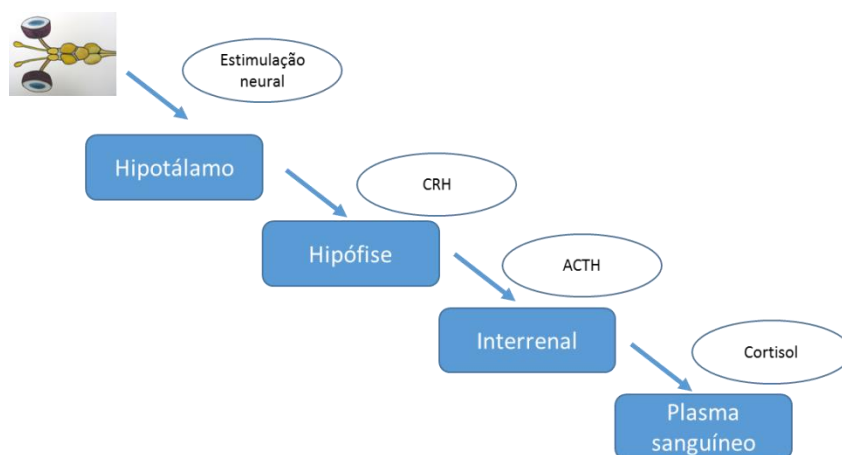


Figura 2- Esquema simplificado do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (CRH- hormona libertadora de corticotropina; ACTH- hormona adrenocorticotrófica) Adaptado de Ellis et al. 2012.

Os elevados níveis de catecolaminas e cortisol podem iniciar as respostas secundárias e terciárias. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal resulta na mobilização de fonte de energia, no esgotamento das reservas de glicogénio, e no aumento dos níveis plasmáticos de glucose, juntamente com a atividade muscular elevada, glicólise anaeróbica e um aumento de lactato no plasma. Por conseguinte, a determinação dos níveis de glucose e de lactato no plasma é muitas vezes usada para avaliar os níveis de stress, juntamente com o cortisol (Barton 2002; Small 2004; Ashley 2007). As respostas secundárias incluem alterações ao nível do metabolismo, do equilíbrio hidromineral e das funções cardiovasculares, respiratórias e imunológicas.

A resposta terciária ocorre como consequência do desencadear das respostas primária e secundária, onde se verifica uma incapacidade de adaptação ao agente de stress, afetando claramente o bem-estar dos peixes. Entre os indicadores de uma resposta terciária estão a redução ou a cessação do crescimento, o aumento da incidência de doenças, o estado de deterioração reprodutiva, alterações de comportamento e até mesmo a sobrevivência (Barton 2002; Huntingford et al. 2006; Pottinger 2008; Ross e Ross 2008).

Todas estas respostas ao stress, ou a maior parte delas, podem ser atenuadas com o uso de anestésicos, durante os procedimentos de rotina em aquacultura e/ou em ensaios experimentais. Para além de prevenir lesões físicas, alguns anestésicos podem reduzir ou bloquear a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, associado ao stress provocado pela manipulação.

2.8. Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo obter informações sobre a eficácia de dois anestésicos (fenoxietanol e óleo de cravinho) em juvenis de corvina. Para tal pretende-se determinar:

- os tempos de indução e de recuperação para diferentes concentrações de anestésicos;
- a concentração ideal que induza a anestesia profunda nos juvenis e que permite a execução de técnicas mais invasivas (recolha de sangue, vacinação, marcações telemétricas);
- se baixas concentrações de anestésico atuam como agentes de stress ou calmantes e descrever o comportamento da corvina quando exposta a baixas concentrações de anestésico, por diferentes períodos de tempo e com elevadas densidades.

3. Material e Métodos

3.1. Peixes

As experiências decorreram entre Janeiro e Fevereiro de 2012, no Instituto Português do Mar e da Atmosfera - Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (IPMA - EPPO) Olhão, Portugal (37°02'N, 7°49'W). Este estudo decorreu no âmbito do projeto AQUACOR onde os juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) utilizados nas diferentes experiências provêm do cultivo desta espécie na EPPO.

Todos os juvenis de corvina utilizados para este estudo eram saudáveis, com base na sua atividade e aparência externa. Os juvenis foram selecionados de acordo com o peso, resultando numa média final de 135±5 g. Estes peixes foram mantidos durante uma semana, para a aclimação, num tanque circular de 1500 L em sistema aberto. Durante este período, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorizados: temperatura (18±0.5°C), salinidade (35±0.2 psu), pH (8±0.4) e oxigénio (80±7.6%). Os peixes foram alimentados duas vezes por dia, até à saciedade, com uma ração comercial (Balance 3, AQUASOJA, São João de Ovar, Portugal). Antes de cada experiência os juvenis encontravam-se em jejum, não tendo sido alimentados nas 24 h anteriores.

3.2. Anestésicos

Os anestésicos utilizados nas diferentes experiências foram o fenoxietanol (Panreac Química SA, Barcelona, Spain) e o óleo de cravinho (BDH Chemicals- Poole Dorset, Inglaterra). As diferentes doses de fenoxietanol foram misturadas diretamente na água salgada. Devido à baixa solubilidade do óleo de cravinho foi necessário proceder primeiramente à sua dissolução em etanol a 90-95% (rácio 1:9) antes de deste ser adicionado na água (Iversen et al. 2003, Cooke et al. 2004, Neiffer e Stamper 2009; Öğretmen e Gökçek 2013). Por precaução, foram efetuadas algumas experiências preliminares de forma a avaliar se o etanol, só por si, poderia afetar o comportamento dos juvenis de corvina. Para isso, foram mantidos dez peixes durante 10 minutos num aquário de 10L com água salgada e com uma concentração de 0.77 mL/L de etanol (a dose mais elevada utilizada para dissolver 85 mL/L de óleo de cravinho). Durante a exposição não foi observado qualquer efeito anestético de etanol nos peixes.

3.3. Indução e Recuperação de anestesia

Para este ensaio foram adotados os estádios de anestesia descritos por Iwama et al. (1989), que consistem em três estádios de indução de anestesia e três estádios de recuperação. O tempo de indução de anestesia consiste no período desde que o peixe é exposto ao anestésico até este exibir a perda total de equilíbrio (estádio AI), perda da maior parte dos movimentos do corpo (estádio AII) e cessação ou imperceptibilidade dos movimentos operculares (estádio AIII). Neste estudo, uma concentração eficaz foi definida como sendo a concentração que induz o estágio AIII de anestesia num peixe em menos de 3 minutos (Ross e Ross 2008). O tempo de recuperação foi descrito como sendo o tempo que o peixe necessita para recuperar os movimentos operculares (estádio RI), a maior parte dos movimentos do corpo (estádio RII) e o total equilíbrio (estádio RIII), desde o momento em que o peixe é colocado no tanque de recuperação.

Os juvenis de corvina (peso 136 ± 9 g) foram capturados do tanque de aclimatação com a ajuda de um camaroeiro e mantidos num tanque de 50L, com água salgada a 18°C e arejamento. Para testar cada concentração de anestésico foram utilizados seis peixes para cada concentração estudada de cada anestésico ($n=60$).

Os dois anestésicos foram testados a diferentes concentrações: 100, 250, 400, 550 e 700 mg/L de fenoxietanol e 25, 40, 55, 70 e 85 mg/L de óleo de cravinho. Cada concentração de anestésico foi previamente dissolvida num aquário de 10L com água salgada e arejamento (saturação de oxigénio acima dos 80% e o pH 8). O aquário foi mantido em “banho-maria” para manter a temperatura nos 18°C e a água foi trocada a cada três peixes para assegurar que estes eram mantidos na concentração correta de anestésico.



Figura 3- Indução de anestesia em juvenis de corvina.

Foi colocado um peixe de cada vez no aquário com o anestésico e o tempo de indução foi contabilizado e registado por um observador. Cada peixe foi monitorizado a cada segundo até os movimentos operculares serem quase inexistentes (anestesia profunda - estágio AIII). Foi definido um tempo máximo de 10 minutos para estágio AIII para ambos os anestésicos, sendo as observações suspensas após este período. Depois de o peixe atingir o estágio AIII, este foi removido do aquário à mão, limpo com um pano para remover algum vestígio de anestésico e foi colocado num aquário de 10 L com água salgada limpa para se proceder à recuperação. O tempo de recuperação foi também monitorizado e registado até o peixe apresentar uma natação normal (estádio RIII).

3.4. Concentrações eficazes para procedimentos evasivos

A recolha de sangue e pequenas cirurgias, como por exemplo a implementação telemétrica, são práticas comuns na investigação de peixes. Mas estes procedimentos envolvem a utilização de materiais evasivos como agulhas e/ou bisturis e implicam que os peixes permaneçam imóveis durante todo o processo. A realização deste tipo de procedimentos em peixes que não estão devidamente anestesiados pode causar lesões ao peixe e ao próprio operador quando se insere a agulha. Assim, e para determinar a concentração de anestésico que permita a recolha de sangue em segurança, foi efetuado outro ensaio com juvenis de corvina com a mesma gama de pesos. Para isso efetuou-se uma simulação de recolha de sangue, onde cada peixe foi picado com uma agulha mas não se recolheu sangue. Para esta simulação foi utilizada a concentração dos dois anestésicos que resultaram anteriormente num tempo de indução inferior a 3 minutos e num tempo de recuperação inferior a 10 minutos (700 mg/L de fenoxietanol e 85mg/L de óleo de cravinho).

Após a preparação do tanque com a concentração de anestésico pretendida, foi colocado um peixe de cada vez e o tempo para atingir o estágio AIII foi registado. O peixe foi removido do tanque e foi então simulada a recolha de sangue na veia caudal com uma seringa e agulha heparinizadas. Se o peixe exibisse alguma reação à picada da agulha, este retornava ao tanque com o anestésico e o tempo para atingir o estágio AIII era registado novamente. Se não se verificasse reação, o peixe era transferido para um tanque de 200L com água salgada limpa e arejamento e o tempo de recuperação era registado.

Após a recuperação, todos os peixes foram agrupados por anestésico e concentração e foram transferidos e mantidos em tanques de 300L. Aqui foram monitorizados durante 48 horas para se verificar a ocorrência de algum efeito secundário provocado pelos anestésicos.

3.5. Efeitos de pequenas doses de fenoxietanol e óleo de cravinho

3.5.1. Efeitos fisiológicos de baixas concentrações de anestésicos

O ensaio de indução-recuperação indicou que podem ser usadas pequenas doses de anestésico para sedar os peixes. Além disso, estas pequenas doses são similares às concentrações utilizadas nas rotinas diárias na EPPO para outras espécies (*Diplodus* sp., *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Epinephelus marginatus*). No entanto, na EPPO, a corvina apresenta um comportamento extremamente agitado quando sedada com a dose de 100 mg/L de fenoxietanol em rotinas diárias como medir e pesar.

Este ensaio teve como objetivo analisar se baixas concentrações de anestésico induzem um efeito sedativo ou se atuam como um agente de stress. Para isso, 18 corvinas (peso médio 133.4 ± 9.3 g) foram divididas em três grupos de seis peixes. Foram adicionadas pequenas concentrações de anestésico em dois grupos, um com 100 mg/L de 2-fenoxietanol e outro com 10 mg/L de óleo de cravinho. E um terceiro grupo onde não foi utilizada anestesia (grupo controle). Os peixes foram mantidos nos tanques com e sem anestésico durante 10 minutos e após esse período cada grupo de peixes foi medido e pesado de forma a simular uma amostragem. Esta operação não demorou mais do que 30 segundos por peixe e posteriormente, cada grupo de peixes foi colocado num aquário de 10 L com água salgada limpa.

Uma vez que as alterações dos níveis de cortisol ocorrem após um período de latência de 30 minutos (Barton 2002), devido à cascata de eventos do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, a recolha de sangue só foi efetuada 30 minutos após a sedação e manipulação de todos os peixes. Para a recolha de sangue foi necessário anestésicar todos os peixes com a concentração pré-determinada para uma recolha de sangue segura. Como tal todos os peixes foram anestesiados com a concentração de 700 mg/L de fenoxietanol. Quando estes atingiram a anestesia profunda, cada peixe foi recolhido do tanque de anestesia com o auxílio de um pano de forma a cobrir os olhos. A recolha

de sangue para determinação de cortisol e glicose, foi efetuada na veia caudal com uma seringa heparinizada (Figura 4). De cada peixe foi recolhido cerca de 1mL de sangue e este foi armazenado num *ependorf* heparinizado e mantido em gelo. Após a recolha de sangue, os peixes foram colocados em aquários de 10L para recuperarem, sendo agrupados por tratamento e transferidos para um tanque de 300L para observação de efeitos secundários durante 48 horas.

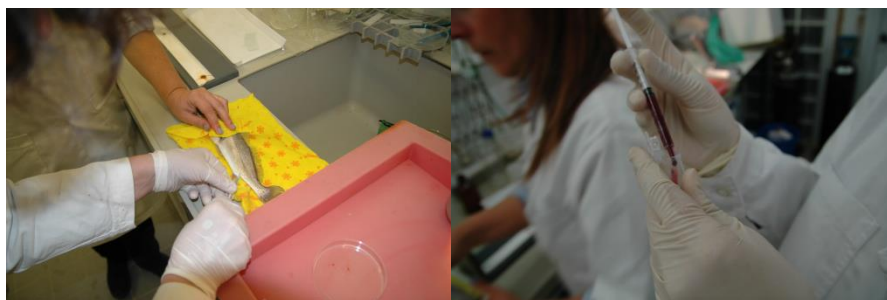


Figura 4- Recolha de sangue na veia caudal em juvenis de corvina.

As amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a $2500 \times g$ numa centrífuga (EBA 21 Hettich, Alemanha) para obtenção do plasma. Com o auxílio de uma pipeta o plasma foi transferido para um novo *ependorf* e armazenado a -20°C para posterior determinação dos níveis de cortisol e glicose. O cortisol foi analisado usando o sistema Mini-Vidas ®R5.6.0 com o kit cortisol Vidas (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). O VIDAS Cortisol S é um teste automatizado que permite a medida quantitativa direta do cortisol no soro ou plasma. O princípio do doseamento associa o método imunoenzimático por competição com uma deteção final em fluorescência (ELFA). O valor do sinal de fluorescência é inversamente proporcional à concentração de antígeno presente na amostra. Terminando o teste, os resultados são calculados em relação à curva padrão.

A glicose foi analisada através de um kit de Glucose (HK) da Sigma (St. Quentin-Fallavier, França). A glicose é fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP) numa reação catalisada pela hexoquinase (HK). Como resultado desta fosforilação produz-se glicose-6-fosfato, que por sua vez é oxidado a 6-fosfogluconato na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), numa reação catalisada por glicose-6-fosfato desidrogenase. Durante esta oxidação uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH, que tem a sua máxima absorvância a 340 nm. Por este motivo as variações de

absorvância que se produzem a 340nm serão diretamente proporcionais à concentração de glucose.

3.5.2. Efeitos da duração prolongada do anestésico em densidades elevadas usando baixas concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho

Algumas das rotinas diárias nas pisciculturas envolvem o confinamento de elevadas densidades de peixes durante longos períodos de tempo com anestesia. Com este ensaio pretende avaliar-se o comportamento e a sobrevivência de juvenis de corvina mantidos em tanques com pequenas doses de anestésico, por longos períodos de tempo e com uma densidade elevada. Para isso foram divididos 40 juvenis de corvina (peso 135.4 ± 4.5 g) em dois tanques de 150L, atingindo a densidade de 18 Kg/m^3 (densidade normalmente utilizada na EPPO para realização de amostragens sem injeção de oxigénio puro). Cada grupo de peixes foi exposto a uma pequena dose de anestesia, 100 mg/L de fenoxietanol (grupo 1) e 10 mg/L de óleo de cravinho (grupo 2). Durante o período de 30, 60 e 120 minutos foi avaliado o comportamento e a sobrevivência dos peixes expostos aos diferentes anestésicos.

Decorridos os 120 minutos, os peixes de cada grupo foram recolhidos e colocados em outro tanque de 200 L com água salgada limpa, para recuperação. O tempo de recuperação e a mortalidade foram registados. Após a recuperação, os peixes foram agrupados por tratamento e foram transferidos para outro tanque onde se mantiveram em observação durante 48 horas, de forma a se avaliar os efeitos secundários dos anestésicos.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As concentrações de anestesia que falharam na indução do estágio AIII, no ensaio da indução-recuperação, não foram incluídas na regressão e na análise de variância simples (One Way ANOVA). A análise da regressão foi realizada entre a dose e o tempo de indução, e entre a dose e o tempo de recuperação, de forma a determinar o R^2 . A distribuição normal dos resultados foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov's e a homegeneidade através do teste Levene's.

Para a comparação dos níveis de glicose foi efetuada uma análise de variância simples (One Way ANOVA) com um nível de significância de $\alpha=0.05$. Quando se verificaram diferenças significativas utilizou-se o teste Duncan post hoc. Na comparação de cortisol entre os grupos foi utilizado uma análise não paramétrica, Kruskal-Wallis, uma vez que o pressuposto de homogeneidade das variâncias não foi atingido após transformação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software IBM SPSS Statistics version 20.0 (2011).

4. Resultados

4.1. Indução e Recuperação de anestesia

Após a análise dos dados obtidos na primeira experiência pode verificar-se que as concentrações de 100 e 250 mg/L de fenoxietanol falharam na indução de anestesia profunda. Isto é, estas concentrações não permitiram que os juvenis de corvina atingissem o estágio AIII de anestesia no período de tempo pré-definido de 10 minutos. No entanto, pode verificar-se que a concentração de 100 mg/L provocou a perda o equilíbrio (AI) na corvina, mas esta continuou a exibir movimentos operculares e de natação. A concentração de 250 mg/L também provocou a perda de equilíbrio na corvina, embora num período de tempo mais curto do que com a concentração de 100 mg/L. O estado de imobilização também foi atingido com esta concentração, embora se tenha verificado a contínua exibição de movimentos operculares e a reação a estímulos externos (i.e. toque com a mão no pedúnculo caudal).

As concentrações intermédias de 400 e 550 mg/L de fenoxietanol induziram a anestesia profunda nas corvinas, conseguindo-se verificar a progressão de todos os estádios de anestesia, incluído o estágio AIII em menos de 10 minutos (Figura 5). Apesar disso, estas concentrações não foram suficientes para que o tempo de indução de anestesia fosse inferior a 3 minutos.

O estado de anestesia profunda da corvina, em menos de 3 minutos só foi atingido com a concentração mais elevada, ou seja, com 700 mg/L de fenoxietanol (Figura 5, Tabela 4). Verificou-se que durante os primeiros estádios de indução os peixes apresentaram um comportamento um pouco diferente relativamente às concentrações mais baixas, desenvolvendo movimentos involuntários (espasmos).

A indução-recuperação de anestesia da corvina ao fenoxietanol encontra-se representada na figura 5, onde se pode verificar que o tempo de indução AIII decresce significativamente com o aumento da concentração de fenoxietanol ($P < 0.001$), seguindo um curva exponencial negativa ($y = 9.4877e^{-0.002x}$, $R^2 = 0.529$). O tempo de recuperação, por sua vez, aumenta significativamente com o aumento da concentração de fenoxietanol ($P < 0.001$), seguindo uma curva polinomial ($y = 4E-05x^2 - 0,0336x + 11,652$, $R^2 = 0.466$).

Relativamente à dose-resposta da corvina ao óleo de cravinho (Figura 6), as baixas concentrações, 25 e 40 mg/L, também falharam na indução do estágio AIII, no período de tempo estipulado (10 minutos). De qualquer forma, estas concentrações causaram na corvina a perda de equilíbrio (estádio AI), a cessação do movimento das

barbatanas (estádio AII), mas os movimentos operculares continuaram a ser perceptíveis. Com a concentração de 55 mg/L os peixes atingiram o estágio AIII, mas falharam em atingi-lo em menos de 3 minutos.

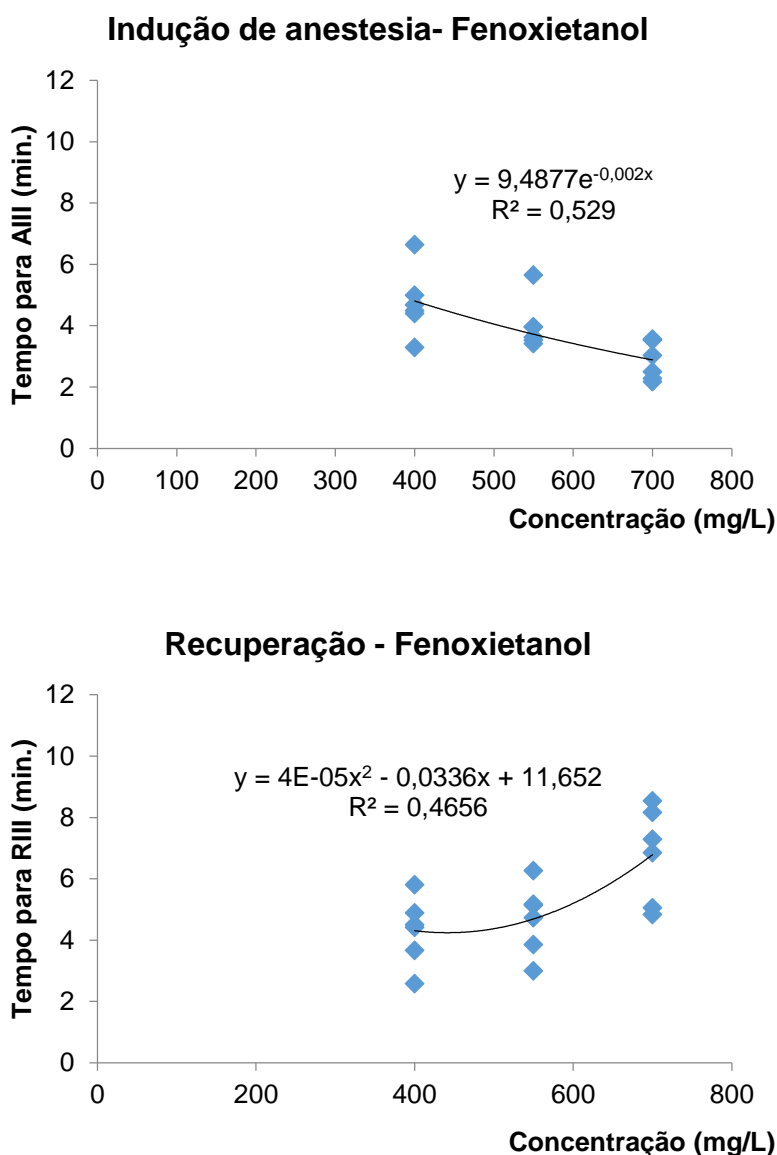


Figura 5- Média (\pm DP) do tempo de indução de anestesia profunda (estádio AIII) e tempo de recuperação (estádio RIII) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) (n=6) mantidos a 18°C e expostos a diferentes concentrações de fenoxietanol.

O tempo de indução com as concentrações mais elevadas (70 e 85 mg/L) parece ser similar (3.05 e 2.47 minutos, respetivamente), e ambos aceitáveis, uma vez que o estágio AIII foi atingido em 3 minutos ou menos (Figura 6; Tabela 4). Tal como aconteceu com o fenoxietanol, a corvina exibiu movimentos involuntários (espasmos) quando

submetida às concentrações mais elevadas de óleo de cravinho. Com as concentrações acima de 55 mg/L, o tempo de indução diminuiu significativamente com o aumento das concentrações deste anestésico ($P < 0.05$), exibindo uma relação exponencial ($y = 42,584e^{-0,035x}$ $R^2 = 0,743$), mas o tempo de recuperação não é afetado com o aumento das concentrações ($P > 0.05$), sendo concentração-independente.

Tabela 4- Tempo de indução (minutos) para a anestesia profunda (AIII) e tempo de recuperação (RIII) de juvenis de corvina, *Argyrosomus regius*, expostos a diferentes concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho a 18°C. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão, n=6. As diferentes letras indicam diferenças significativas entre tratamentos para $P < 0.05$.

Fenoxietanol (mg/L)	400	550	700	p
AIII	4.76 \pm 1.09 ^a	4.03 \pm 0.83 ^a	2.85 \pm 0.62 ^b	0.005
RIII	4.31 \pm 1.09 ^a	4.69 \pm 1.14 ^a	6.79 \pm 1.55 ^b	0.010
Óleo de cravinho (mg/L)	55	70	85	p
AIII	7.28 \pm 2.29 ^a	3.06 \pm 0.53 ^b	2.47 \pm 0.25 ^c	0.000
RIII	7.77 \pm 1.64 ^{ab}	6.72 \pm 2.18 ^b	6.53 \pm 1.16 ^a	0.028

Durante o tempo de indução e a recuperação verificou-se que o comportamento da corvina foi bastante similar quando exposta aos dois anestésicos. No entanto, foram observadas pequenas diferenças no comportamento de certos indivíduos, para além dos espasmos, durante a indução de anestesia com as concentrações mais altas dos anestésicos. Durante a indução de anestesia com o óleo de cravinho, o estágio AII e AIII ocorreram quase em simultâneo mas com o fenoxietanol a corvina cessou primeiro os movimentos operculares e só depois o movimento das barbatanas.

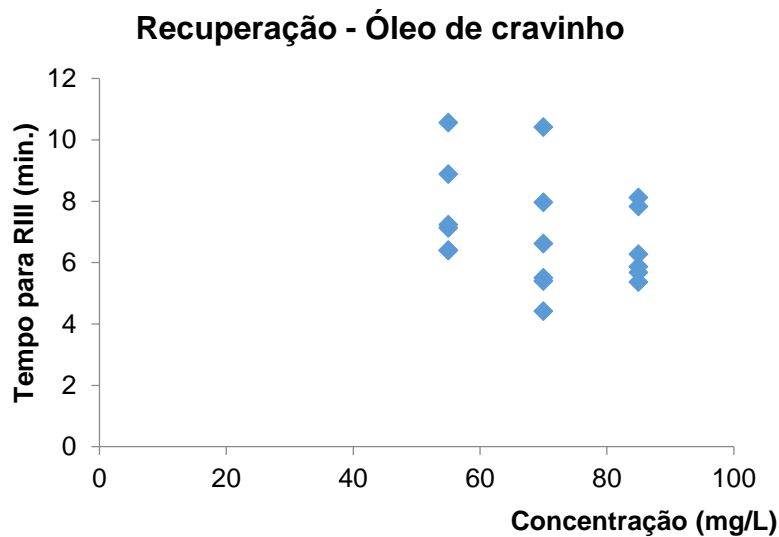
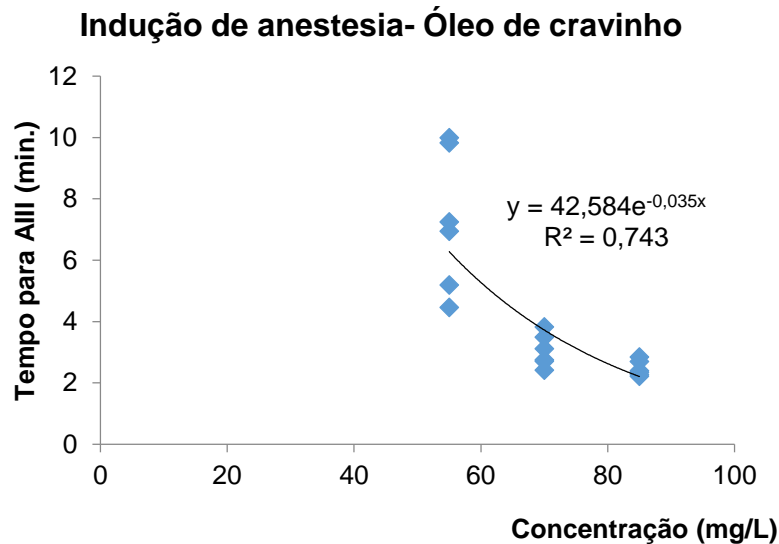


Figura 6- Média (\pm DP) do tempo de indução para a anestesia profunda (estádio AIII) e tempo de recuperação (estádio RIII) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) (n=6) mantidos a 18°C e expostos a diferentes concentrações de óleo de cravinho.

A ação do óleo de cravinho parece ser mais eficiente do que a do fenoxietanol, alcançando o estágio AIII num período de tempo mais curto (Tabela 4). Por outro lado, o tempo de recuperação variou entre 6.37 e 8.18 minutos para as diferentes concentrações de óleo de cravinho, ao passo que para o fenoxietanol esse tempo foi menor, variando entre 3.77 e 6.78 minutos.

As concentrações de 700 mg/L de fenoxietanol e 85 mg/L de óleo de cravinho utilizadas para a simulação de recolha de sangue mostraram-se eficazes, uma vez que induziram a anestesia profunda (atingindo o estágio AIII em 3 minutos e recuperando

em 10 minutos) nos juvenis de a corvina e os mesmos não exibiram qualquer reação aquando da penetração da agulha na pele.

4.2. Efeitos de baixas concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho

Na análise dos valores do cortisol verificou-se uma grande variabilidade dentro dos diferentes grupos. Desta forma, os valores foram analisados através de um teste não paramétrico (teste mediana) onde não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Contudo, o valor médio de cortisol no grupo Controlo foi de 86 ng/mL, ao passo que, os valores de cortisol nos grupos do óleo de cravinho e do fenoxietanol foram superiores a 117 ng/mL (Figura 7). Os valores de glucose (Figura 8) também não apresentam diferenças significativas mostrando-se bastante semelhantes entre os diferentes grupos ($P > 0.05$).

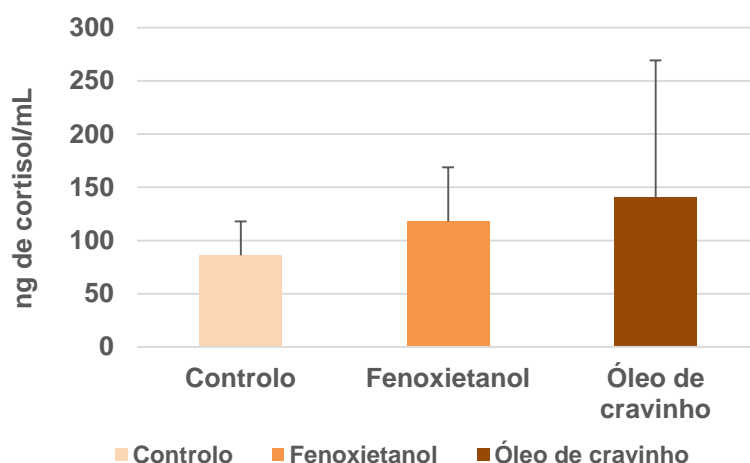


Figura 7- Concentrações de cortisol plasmático na corvina, *Argyrosomus regius*, manipulada para amostragem biológica com baixas concentrações de anestesia (100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho, mantidas durante 30 minutos em água limpa antes da recolha de sangue. O grupo controlo foi submetido ao mesmo procedimento mas sem a utilização de anestesia. Os valores são apresentados em médias \pm desvio padrão, $n=6$.

Durante esta experiência foram observadas diferenças no comportamento da corvina quando mantida a elevadas densidades e quando exposta a baixas concentrações de anestesia. Depois de expostas a 100 mg/L de fenoxietanol, 25% das corvinas perderam o equilíbrio e começaram a nadar com a cabeça acima da superfície da água durante os primeiros 30 minutos. Contudo, após os 60 e os 120 minutos, as

mesmas recuperaram o equilíbrio e começaram a nadar normalmente na coluna de água. Quando expostas a 10 mg/L de óleo de cravinho, apenas 10% dos peixes perderam o equilíbrio após 30 minutos. Os restantes 90% mantiveram uma natação normal mas concentraram-se sobretudo no fundo do tanque. Ao fim de 60 e 120 minutos todos os peixes se encontravam com uma natação normal mas sempre no fundo do tanque.

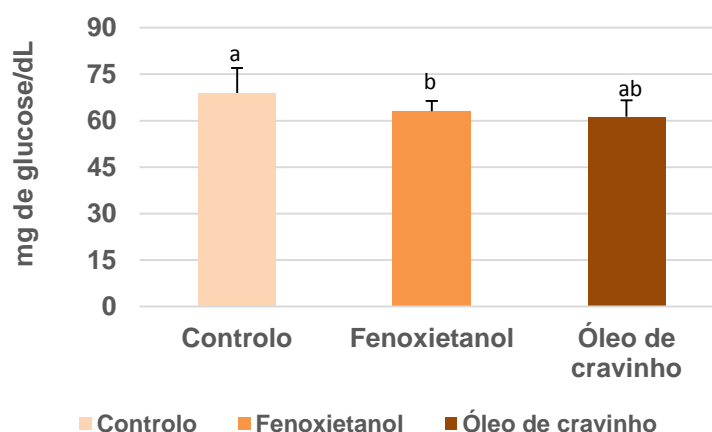


Figura 8- Concentrações de glicose na corvina, *Argyrosomus regius*, manipulada para amostragem biológica com baixas concentrações de anestesia (100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho, mantidas durante 30 minutos em água limpa antes da recolha de sangue. O grupo controlo foi submetido ao mesmo procedimento mas sem a utilização de anestesia. Os valores são apresentados em médias±desvio padrão, n=6.

No decorrer da experiência, os parâmetros de qualidade da água foram monitorizados e mantidos em valores aceitáveis, 80% de saturação de oxigénio, à temperatura de 18°C e o pH de 8.1. Não se registou qualquer mortalidade enquanto se mantiveram as corvinas nos diferentes banhos de anestesia (100 mg/L de fenoxietanol ou 10 mg/L de óleo de cravinho), à densidade de 18 kg/m³ durante 30, 60 e 120 minutos.

Os diferentes grupos de peixes que, após 48h do fim das experiências, se mantiveram em observação, permaneceram vivos e saudáveis.

5. Discussão

O presente estudo demonstra que o fenoxietanol e o óleo de cravinho são anestésicos eficazes para juvenis de corvina. Nas concentrações apropriadas, os dois anestésicos induzem a anestesia profunda em menos de 3 minutos e a recuperação num período de tempo aceitável. Os peixes progrediram sequencialmente pelos típicos estádios de anestesia e de recuperação descritos por Iwama et al. (1989). A eficácia destes anestésicos nas rotinas diárias em aquacultura tem sido estudada em diferentes espécies de peixes, sendo que algumas delas se encontram descritas na tabela 3 (Iwama et al. 1989; Mylonas et al. 2005; Tsantilas et al. 2006; Weber et al. 2009; Serezli et al. 2011; Shalwei et al. 2012). Com estes estudos pode concluir-se que as concentrações dos anestésicos podem variar com a temperatura da água, a espécie e mesmo com o peso dos peixes dentro da mesma espécie, reforçando a importância da determinação das concentrações de anestesia nas novas espécies.

Os estudos onde o fenoxietanol e o óleo de cravinho são utilizados como anestésicos (Mylonas et al. 2005; Weber et al. 2009; Filiciotto et al. 2012; Ghanawi et al. 2013; Ögretmen e Gökçek 2013), pode verificar-se que as concentrações de óleo de cravinho são normalmente 10 vezes mais baixas que as concentrações de fenoxietanol, indicando o poder do óleo de cravinho e/ou sugerindo um diferente mecanismo de ação deste produto. De acordo com Zahl et al. (2012), o mecanismo de ação exato dos dois anestésicos em peixes ainda não foi reportado. No entanto alguns trabalhos sugerem que o fenoxietanol exibe alguma atividade inibitória no recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) ao passo que, o óleo de cravinho potencia o recetor ácido gama-amino butírico do tipo A (GABA_A) além de inibir o NMDA. O facto de o óleo de cravinho afetar diferentes tipos de recetores pode justificar a sua elevada eficiência e o uso de pequenas doses.

A eficácia dos anestésicos em peixes tem sido objeto de vários estudos de forma a maximizar o bem-estar dos peixes durante os procedimentos de manuseamento. Contudo, a eficácia dos anestésicos é influenciada por fatores biológicos (espécie, idade, peso, área branquial, condição corporal) e ambientais (temperatura, pH) (Iversen et al. 2003; Coyle et al. 2004; Neiffer e Stamper 2009). Desta forma, é muitas vezes necessário determinar a dose adequada dos diferentes anestésicos.

O tempo máximo permitido para a indução da anestesia profunda em peixes é de 10 minutos. De acordo com Ross e Ross (2008) o anestésico ideal para o peixe deve induzir a anestesia em menos de 3 minutos, com a total perda de equilíbrio e o tónus muscular para que o manuseamento seja mais fácil. Mais ainda, o anestésico deve permitir uma recuperação rápida (em menos de 5 minutos), deve deixar baixos resíduos

nos tecidos, ser seguro para os utilizadores, bem como ser de baixo custo e de fácil utilização (Tsantilas et al. 2006; Weber et al. 2009; Serezli et al. 2011). Neste estudo, a perda de equilíbrio total e de tónus muscular é a condição equivalente ao estágio AIII de anestesia descrito por Iwama et al. (1989).

Na experiência da indução e recuperação de anestesia, as concentrações acima de 250 mg/L de fenoxietanol e acima de 40 mg/L de óleo de cravinho atuam dentro do tempo máximo aceitável, uma vez que a anestesia profunda dos juvenis de corvina foi induzida em menos de 10 minutos. Mas as concentrações ideais de anestesia foram os 700 mg/L de fenoxietanol e 85 mg/L de óleo de cravinho, induzindo a anestesia em menos de 3 minutos e a recuperação em 5 minutos. Seguindo este critério, estas concentrações induziram a anestesia profunda em juvenis de corvina rapidamente e permitiram uma rápida e tranquila recuperação sem provocar a morte de qualquer peixe.

A indução de anestesia, o tempo de recuperação e as concentrações dos anestésicos (fenoxietanol e óleo de cravinho) necessários para atingir os diferentes estádios, em juvenis de corvina, exibiram algumas similaridades e diferenças relativamente a outras espécies de peixes. Para o fenoxietanol, a indução de anestesia resultou numa relação exponencial negativa entre a concentração e o tempo de indução, ao passo que o tempo de recuperação seguiu uma função polinomial onde as concentrações mais altas resultam no aumento do tempo de recuperação. Este padrão de variação foi idêntico ao descrito para outras espécies de peixes marinhos, como o esturjão-beluga *Huso huso*, o sargo-comum, *Diplodus sargus*, o sargo-bicudo, *Diplodus puntazzo*, e a corvina, *Argyrosomus regius* (Tsantilas et al. 2006; Serezli et al. 2011; Shaluei et al. 2012). Mas para outras espécies como o linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) foi observada uma resposta oposta, onde as doses mais elevadas de fenoxietanol resultaram em períodos de recuperação mais curtos (Weber et al. 2009). Diferentes espécies de peixes requerem diferentes concentrações de anestésicos para atingir a anestesia profunda em menos de 10 minutos. Para o esturjão foram utilizados 700 mg/L de fenoxietanol (193.35 ± 11.26 g a $19 \pm 1^\circ\text{C}$; Shaluei et al. 2012), ao passo que para outras espécies foram necessárias concentrações mais baixas, nomeadamente 0.3 mL/L (300 mg/L) para juvenis de corvina (1.3 ± 0.03 g a 25°C ; Serezli et al. 2011). Estes estudos indicam que a resposta biológica relativamente a um anestésico é espécie-dependente, além do peso dos peixes e dos fatores ambientais previamente descritos por Weber et al. (2009).

O óleo de cravinho foi eficaz com quase 10 vezes menos a concentração utilizada de fenoxietanol. Esta é uma das vantagens do óleo de cravinho, uma vez que

se torna mais barato para a aquacultura e minimiza a contaminação ambiental por se tratar de um composto vegetal, esperando que se decomponha rapidamente no ambiente natural (Soto e Burhanuddin 1995; Mylonas et al. 2005). Neste estudo, o tempo de indução para o óleo de cravinho decresce com o aumento das doses de anestésico, seguindo uma curva exponencial. O tempo de recuperação foi idêntico, independentemente das concentrações de anestesia. Anteriormente, um padrão similar já tinha sido descrito para o linguado senegalês (Weber et al. 2009), onde foram observadas diferenças significativas no tempo de indução com o óleo de cravinho, mas não se encontraram diferenças significativas no tempo de recuperação.

Não existe literatura disponível sobre a eficácia das doses de óleo de cravinho que devem ser administradas no manejo da corvina. Para várias espécies de peixes ósseos a dose eficaz de óleo de cravinho para atingir a anestesia profunda pode variar entre 20 e 150 mg/L (Mylonas et al. 2005).

Os procedimentos cirúrgicos como pequenas incisões para remoção de tumores, implantação de dispositivos de telemetria, marcações e práticas de recolha de sangue, que envolvem o uso de agulhas e outros instrumentos cirúrgicos, requerem que o peixe esteja anestesiado profundamente por forma a evitar lesões no peixe e no próprio operador. À temperatura de 18-19°C, as concentrações de 700 mg/L de fenoxietanol e 85 mg/L de óleo de cravinho permitem a recolha de sangue segura na corvina, sem qualquer tipo de reação, desde que a anestesia profunda seja atingida (estádio AIII). Para outras espécies, foram descritas diferentes concentrações para a recolha de sangue, como 200 mg/L, 500-600 mg/L e 700-900 mg/L de fenoxietanol para o serrano estriado (King et al. 2005), o linguado do Senegal (Weber et al. 2009) e para o esturjão-beluga (Shaluei et al. 2012), respetivamente. Relativamente ao óleo de cravinho, a concentração de 30 mg/L foi usada para o salmão do Atlântico, *Salmo salar* (Iversen et al. 2003) e 80 mg/L para o linguado do Senegal (Weber et al. 2011).

Embora existam benefícios no uso de anestesia durante as rotinas práticas em aquacultura, os anestésicos também podem causar respostas negativas de stress (Iwama et al. 1989; Ortuño et al. 2002; Ross e Ross 2008). Para procedimentos de rotina, a sedação (sem perda de equilíbrio) (i.e. 100 mg/L de fenoxietanol de acordo com Shaluei et al. 2012) é mais aconselhada do que a anestesia profunda, sendo utilizadas doses mais pequenas de anestésico, poupando o ambiente e os custos.

Os juvenis de corvina exibem sinais de stress (comportamento errático e irrequieto) quando são expostos a pequenas doses de anestesia, comparado com as situações em que não se usa anestesia, sugerindo um aparente efeito de stress do

próprio anestésico. Ortuño et al. (2002) descreve que a dose de sedação do fenoxietanol (60 mg/L) induz uma resposta de cortisol na dourada idêntica ao stress provocado pela densidade (100 Kg/m³). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de cortisol entre os grupos quando foram usadas baixas concentrações de anestésico (fenoxietanol e óleo de cravinho) e sem anestesia (controlo) para a manipulação dos peixes (pesagem). Um outro estudo onde a corvina não foi manipulada, os valores médios de cortisol foram de 12ng/mL (L. Ribeiro, IPMA, dados não publicados), o qual é 7 vezes mais baixo do que os valores obtidos neste estudo, indicando que a manipulação provocou stress aos peixes e o uso de baixas concentrações de anestesia não minimizaram a resposta ao stress. Então, de facto e a corvina exposta a baixas concentrações de fenoxietanol e óleo de cravinho desenvolve uma resposta ao stress maior, mas não significativamente diferente, do que quando não é exposta a anestesia. Além disso, a glucose plasmática (resposta secundária ao stress) foi similar nas corvinas expostas e não expostas aos anestésicos, indicando reações fisiológicas similares ao aumento de cortisol no sangue. Os valores da glucose foram também superiores dos que normalmente são observados para esta espécie (Ribeiro et al. 2015) sugerindo a mobilização de metabolitos como resposta ao stress de modo a reestabelecer a homeostasia. Além disso, o aumento da glucose plasmática tem sido descrita para a dourada quando anestesiada com o fenoxietanol (Molinero e Gonzalez 1995; Ortuño et al. 2002). Como observado para outras espécies de peixes como o esturjão (Shaluei et al. 2012) e para a dourada (Molinero e Gonzalez 1995), as pequenas doses de fenoxietanol induzem elevados níveis de cortisol e glucose. As baixas concentrações de anestésico como 100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho são insuficientes para provocar a depressão da função nervosa na corvina.

6. Considerações Finais

Deste trabalho pode concluir-se que o fenoxietanol e o óleo de cravinho podem ser usados como anestésicos em juvenis de corvina. As concentrações mais adequadas para atingir a anestesia profunda à temperatura de 18°C são de 700 mg/L para o fenoxietanol e 85 mg/L para o óleo de cravinho. Estas concentrações são também aceitáveis para a recolha de sangue.

A concentração adequada de anestésico para a sedação deve reduzir a atividade do peixe, facilitando os procedimentos de manuseamento e permitir a rápida recuperação, acelerando assim os procedimentos de rotina. Assim, para induzir a sedação de juvenis de corvina durante um transporte (60-120 minutos) ou para procedimentos de triagem podem ser utilizados 100 mg/L de fenoxietanol e 10 mg/L de óleo de cravinho.

7. Investigação futura

Uma vez que a produção de corvina tem vindo a aumentar em vários países e devido à escassez de protocolos de anestesia para esta espécie, a perspetiva de desenvolver trabalhos nesta matéria é diversa.

Após a realização deste trabalho e depois de uma pesquisa exaustiva sobre anestésicos, seria interessante continuar a estudar a eficácia dos diferentes anestésicos com a corvina (*Argyrosomus regius*), com especial enfoque no MS222 e no Aqui S. Esta escolha prende-se sobretudo pelo facto do MS222 ser aprovado pela União Europeia em peixes que se destinam ao consumo humano e o Aqui S por ser uma alternativa ao elevado custo do MS222.

A escolha de um anestésico depende de vários fatores, sendo a temperatura e o peso os mais estudados. Uma vez que a temperatura ótima para o crescimento da corvina se situa entre 22-25°C, seria interessante desenvolver um protocolo de anestesia para esta gama de temperaturas. Mais ainda, nas pisciculturas a manipulação de peixes é uma prática frequente, que vai desde a fase larvar até ao chamado peso comercial. Desta forma, a determinação das concentrações necessárias para a sedação e/ou anestesia profunda em corvinas com diferentes tamanhos também seria um dos trabalhos a realizar futuramente.

8. Referências

- Akbulut B., E. Çakmak, O. T. Özel, N. Dülger, 2012. Effect of Anaesthesia with Clove Oil and Benzocaine on Feed Intake in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 12: 667-673.
- Ashley P. J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science 104: 199-235.
- Barton B. A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integr Comp Biol 42: 517-525.
- Cárdenas S., 2010. Crianza de la corvina (*Argyrosomus regius*). Cuadernos de Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de investigaciones científicas, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Chaieb K., H. Hajlaoui, T. Zmantar, A. B. Kahla-Nakbi, M. Rouabhia, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. Phytother Res 21: 501-506.
- Chatzifotis S., M. Panagiotidou, N. Papaioannou, M. Pavlidis, I. Nengas, C.C. Mylonas, 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. Aquaculture 307: 65-70.
- Chatzifotis S., M. Panagiotidou, P. Divanach, 2012. Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). Aquac. Int. 20: 91-98.
- Cooke S., S. Suski, K. Ostrand, B. Tufts, D. Wahl, 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture 239: 509–529.
- Coyle S. D., R. M. Durborow, and J. H. Tidwell, 2004. Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture, SRAC Publication No. 3900.
- Duncan N., A. Estevez, F. Padros, C. Aguilera, F. E. Montero, F. Norambuena, I. Carazo, R. Carbo, C. C. Mylonas, 2008. Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). Cybium 32: 332-333.
- Duncan N., A. Estevez, H. Fernández-Palacios, I. Gairin, C. M. Hernández-Cruz, J. Roo, D. Schuchardt, R. Vallés, 2013. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. In: Advances in aquaculture

hatchery technology. Ed. by G. Allan and G. Burnell, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 242.

Ellis T., H. Y. Yildiz, J. López-Olmeda, M. T. Spedicato, L. Tort, Ø. Øverli, C. I. M. Martins, 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem* 38: 163-188.

FAO 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FEAP 2015. European Aquaculture production report 2005-2014: <http://www.feap.info/>

Filiciotto F., G. Buscaino, G. Buffa, A. Bellante, V. Maccarrone, S. Mazzola, 2012. Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effects on some haematological parameters in farmed european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11: 494-502.

Gabriel U. U. e O. A. Akinrotimi, 2011. Management of Stress in Fish for Sustainable Aquaculture Development. *Researcher* 3: 28-38.

Ghanawi J., S. Monzer, I. P. Saoud, 2013. Anaesthetic efficacy of clove oil, benzocaine, 2-phenoxyethanol and tricaine methanesulfonate in juvenile marbled spinefoot (*Siganus rivulatus*). *Aquaculture Research* 44: 359–366.

Huntingford F. A., C. Adams, V. A. Braithwaite, S. Kadri, T. G. Pottinger, P. Sandoe, J. F. Turnbull, 2006. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology* 68: 332-372.

Iversen M., B. Finstad, R. McKinley, R. Eliassen, 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqu-i-S™ Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221: 549–566.

Iwama G. K., P. A. Ackerman, 1994. Anaesthetics Pag 1-15 in: P.W. Hochachka & T.P. Mommsen (ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* vol. 3. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

Iwama G. K., J. C. McGeer, M. P. Pawluck, 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can J Zool* 67: 2065-2073.

King W. V., B. Hooper, S. Hillsgrove, C. Benton, D. L. Berlinsky, 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquac Res* 36: 1442-1449.

Kreiberg H. 2000. Stress and Anesthesia. Pag. 503-509 in: Ostrander, G. K. (ed) The Laboratory Fish. Academic Press, Baltimore, MD, USA.

Lawrence A. B., 2008. What is Animal Welfare? Pages 7-16 in: Branson, E. (ed) Fish Welfare. Fish Veterinary Society. Blackwell Publishing, Oxford.

Moliner A., J. Gonzalez, 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Spraus aurata* L.) during confinement. Comp Biochem Physiol A 111: 405-414.

Monfort M., 2010. Present market situation and Prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. Studies and Reviews, General Fisheries Commission for the Mediterranean. FAO. Italy, Rome.

Mylonas C. C., G. Cardinaletti, I. Sigelaki, A. Polzonetti-Magni, 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture 246: 467-481.

Mylonas C. C., N. Mitrizakis, M. Papadaki, I. Sigelaki, 2013. Reproduction of hatchery produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. Aquaculture 414-415: 309-317.

Neiffer D., M. Stamper, 2009. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. ILAR Journal 50: 343-360.

Öğretmen F. e K. Gökçek, 2013. Comparative Efficacy of Three Anesthetic Agents on Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 13: 51-56.

Ortuño J., M. A. Esteban, J. Meseguer, 2002. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. Vet. Immunol. Immunopathol. 89: 29-36.

Perdikaris C., C. Nathanailides, E. Gouva, U. U. Gabriel, K. Bitchava, F. Athanasopoulou, A. Paschou, I. Paschos, 2010. Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). Acta Vet. Brno 79: 481-490.

Poli B. M., G. Parisi, G. Zampacavallo, F. Iurzan, M. Mecatti, P. Lupi, A. Bonelli, 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. Aquaculture International 11: 301-311.

- Pottinger T. G., 2008. The Stress Response in Fish – Mechanisms, Effects and Measurement Pag 32-48 in: Branson, E. (ed) Fish Welfare. Fish Veterinary Society. Blackwell Publishing, Oxford.
- Readman G. D., S. F. Owen, J. C. Murrell, T. G. Knowles, 2013. Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive? PLOS ONE 8: 1-7.
- Ribeiro L., F. Soares, H. Quental-Ferreira, A. Gonçalves, P. Pousão-Ferreira, 2013. Portuguese Research Studies Meagre Production in Earthen Ponds. Global Aquaculture Advocate 16: 38-40.
- Ribeiro L., J. Moura, M. Santos, R. Colen, V. Rodrigues, N. Bandarra, F. Soares, P. Ramalho, M. Barata, P. Moura, P. Pousão-Ferreira, J. Dias, 2015. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). Aquaculture 447: 116-128.
- Roo J., C. M. Hernández-Cruz, C. Borrero, D. Schuchardt, H. Fernández-Palacios, 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. Aquaculture 302: 82-88.
- Ross L. G., B. Ross, 2008. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 3rded. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Serezli R., F. Basaran, M. C. Gungor, B. A. Kaymakci, 2012. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). J Appl Ichthyol 28: 87-90.
- Shalvei F., A. Hedayati, A. Jahanbakhshi, M. Baghfalaki, 2012. Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish Physiol Biochem 38: 1627-1634.
- Small B. C., 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. Aquaculture 238: 469-481.
- Soares F., H. Quental-Ferreira, M. Moreira, A. C. Mendes, M. Gamboa, M. Barata, L. Ribeiro, M. E. Cunha, P. Pousão-Ferreira, 2012. Pathologies affecting farmed meagre (*Argyrosomus regius*) at Ipimar's Research Center – Southern Portugal. Pag. 1043 Aqua 2012, Global aquaculture securing our future. European Aquaculture Society, Praga, República Checa.
- Soto C., G. Burhanuddin, 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight for rabbitfish (*Siganus lineatus*). Aquaculture 136: 149-152.

Summerfelt R.C., L. S. Smith, 1990. Anaesthesia, Surgery and related techniques. Pag 213- 272. in: C. B. Scherelk and P.B. Moyle (ed) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

Tsantilas H., A. D. Galatos, F. Athanassopoulou, N. N. Prassinos, K. Kousoulaki, 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C.. Aquaculture 253: 64–70.

Ucar A., M. Atamanalp, 2010. The effects of natural (Clove oil) and synthetic (2-phenoxyethanol) anesthesia substances on hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). J. Anim. Vet. Adv. 9: 1925-1933.

Weber R. A., J. B. Peleteiro, L. O.García-Martín, M. Aldegunde, 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture 288: 147-150.

Weber R. A., J. J. Pérez-Maceira, J. B. Peleteiro, L. García-Martín, M. Aldegunde, 2011. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and second stress response in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture 321: 108-112.

Weyl O., H. Kaiser, T. Hecht, 1996. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. Aquaculture Research 27: 757-764.

Zahl I. H., A. Kiessling, O. B. Samuelsen, M. K. Hansen, 2009. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. Aquaculture 295: 52–59.

Zahl, I. H., O. Samuelsen, and A. Kiessling, 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish Physiology and Biochemistry 38: 201-218.