

Toxicidade aguda de eugenol em juvenis I de Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Rodrigo Pratte-Santos¹, rodrigopratte@hotmail.com; Frederico Augusto Delunardo Carrielo²

1. Mestre em Ecologia de Ecossistemas, pelo Centro Universitário Vila Velha (UVV), ES; professor na Faculdade Pio XII, Cariacica, ES.
2. Mestre pelo Centro Universitário Vila Velha (UVV), ES.

Artigo recebido em 25 mar. 2010 e aprovado em 18 ago. 2010

RESUMO: A toxicidade do eugenol foi avaliada em tilápia por intermédio da análise de CL_{50} após exposição a diferentes concentrações, durante um período de 10 minutos com recuperação de 1 hora. Foram utilizados 75 juvenis I ($0,44 \pm 0,11$ g e $3,27 \pm 0,21$ cm) e aquários com água suplementada com uma solução de eugenol nas seguintes concentrações: 50, 60, 70, 80, e 90mg.L⁻¹ (n=5). Os resultados demonstraram que o eugenol se mostrou eficiente como substância anestésica para juvenis I de *Oreochromis niloticus*. Todas as concentrações foram capazes de induzir a anestesia profunda em poucos minutos. A CL_{50} estimada (71,68 mg.L⁻¹) foi satisfatória.

Palavras-chave: anestésico, eugenol, *Oreochromis niloticus*, toxicidade.

RESUMEN: Toxicidad aguda de eugenol en juveniles de tilapia I (*Oreochromis niloticus*). La toxicidad del eugenol se evaluó en tilapia a través

del análisis de CL50 después de la exposición a concentraciones diferentes durante un período de 10 minutos a 1 hora de recuperación. Un total de 75 menores I ($0,44 \pm 0,11$ gy $3,27 \text{ cm} \pm 0,21$) y se completará con los tanques de agua con una solución de eugenol en las siguientes concentraciones: 50, 60, 70, 80 y 90 mg.l-1 ($n = 5$). Los resultados mostraron que el eugenol explicó su eficacia como anestésico para la sustancia de menores I *Oreochromis niloticus*. Todas las concentraciones fueron capaces de inducir la anestesia profunda en cuestión de minutos. El CL50 (mg.L 71.68-1) fue satisfactoria.

Palabras llaves: eugenol anestesia, *Oreochromis Nilo*, toxicidad.

ABSTRACT: Acute toxicity of eugenol in Tilapia's juvenile I (*Oreochromis niloticus*). Acute toxicity of eugenol in juvenile I Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The toxicity of eugenol was evaluated in tilapia through the analysis of CL50 after exposure to different concentrations for a period of 10 minutes to 1 hour of recovery. A total of 75 juvenile I (0.44 ± 0.11 g and 3.27 ± 0.21 cm) and supplemented with water tanks with a solution of eugenol in the following concentrations: 50, 60, 70, 80 and 90 mg.l-1 ($n = 5$). The results showed that eugenol proved to be effective as anesthetic substance for juvenile I *Oreochromis niloticus*. All concentrations were able to induce deep anesthesia in minutes. The CL50 (71.68 mg.L-1) was satisfactory.

Keywords: anesthetic eugenol, *Oreochromis niloticus*, toxicity.

Introdução

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécies de peixe mais criadas no mundo (FAO, 2002) e a mais criada no Brasil (IBAMA, 2003), sendo cultivada em 22 estados brasileiros, os quais possuem uma produção

anual entre 30 e 40 mil toneladas (ARRUDA, 2004). A tilápia do Nilo foi uma das primeiras espécies oriundas da aquicultura a ser beneficiada, sendo atualmente comercializada na forma de filés congelados, porém sua tecnologia emergente proporciona um rendimento baixo, em torno de 30 a 38% (NOGUEIRA, 2003).

As práticas comumente utilizadas nas pisciculturas como a manipulação dos animais, o emprego de alta densidade de estocagem, o transporte, interações biológicas, qualidade da água e manejo de alimentação podem favorecer o estresse nos peixes. Informações fisiológicas baseadas no estresse provocado pelas práticas culturais podem ser úteis no desenvolvimento de novas e melhores técnicas para aumentar o sucesso de cultivo (CARNEIRO; URBINATI, 1999). Sabe-se que a literatura referente a anestésicos para esta espécie é bastante limitada, havendo referência apenas para a benzocaína, revisto por Ross e Ross (1999). Sendo assim, para auxiliar no desenvolvimento da criação da espécie é necessário procurar anestésicos alternativos.

Os movimentos bruscos dos animais colocam em risco a segurança dos trabalhadores, principalmente quando há manuseio de equipamentos perfurocortantes. O risco aumenta quando os peixes são de grande porte. Desta forma, o uso de anestésicos é imperativo para fins de segurança durante práticas de manejo como biometrias, marcações, injeções, entre outros (BARBOSA et al., 2007).

Tendo em vista a alta periculosidade do manejo de peixes, o uso de anestésicos vem crescendo exponencialmente na piscicultura. Tais substâncias também são recomendadas para reduzir o estresse e a mortalidade dos peixes durante o transporte. Diversas substâncias químicas como a triclaína metanosulfato (MS 222), a quinaldina e o 2-fenoxietanol vêm sendo utilizadas em anestesia de animais aquáticos, porém apresentam certas inconveniências tais como alto custo, difícil obtenção, além de efeitos tóxicos como a irritação das brânquias e perda do muco nos peixes e danos córneos no operador (ROUBACH et al., 2005).

Como alternativa a estes problemas, o uso de óleos essenciais derivados de plantas tem se mostrado uma opção viável frente tais dificuldades de obtenção dos químicos utilizados para esta finalidade (FAÇANHA; GOMES, 2005; CUNHA, 2007). O óleo de cravo é um óleo essencial extraído das folhas e brotos da árvore *Eugenia caryophyllata*, nativa da Ásia e adaptada a América do Sul. O princípio ativo do óleo de cravo é o eugenol que representa de 70 a 90 % do composto (INOUE et al., 2003; ROUBACH et al., 2005). Muito utilizado na odontologia, o óleo de cravo apresenta várias características de um anestésico adequado para peixes como baixo custo e facilidade de obtenção, alto grau de eficiência, bem como nenhuma propriedade tóxica aparente (ROSS; ROSS, 1999).

Para a avaliação da toxicidade de uma substância, são realizados testes de toxicidade aguda, que consistem em determinar a sua concentração média letal (CL_{50}). Sprague (1990) define CL_{50} como a concentração de uma substância que causa a mortalidade da metade de um grupo de organismos num determinado tempo de exposição. Estes testes, utilizados para avaliar a sensibilidade dos organismos a substâncias tóxicas, apresentam resultados que variam de acordo com os parâmetros físicos e químicos da água e biológicos dos organismos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial tóxico de uma solução anestésica de eugenol em diferentes concentrações no *Oreochromis niloticus* durante a realização de um teste de toxicidade agudo.

I – Material e métodos

Neste estudo, foram utilizados os juvenis I de tilápia, pois é o início do estágio juvenil, etapa do ciclo de vida ideal para observações de toxicidade, sendo que em determinadas situações podem ser considerados alevinos num estágio avançado. Estes peixes foram fornecidos pelo Bioalevinos, piscicultura em Ibiraçu, Espírito Santo, e mantidos em condições apropriadas no Laboratório Ecotoxicologia Aquática do Complexo Biopráticas do Centro Universitário Vila Velha (UVV). Aproximadamente 90 peixes ($0,44 \pm 0,11$ g e $3,27 \pm 0,21$ cm; média \pm desvio padrão) foram aclimatados em um tanque de 450 L, com sistema de aeração constante, durante uma semana. Neste período, os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes contendo 36 % de proteína bruta.

Durante os experimentos, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados. O oxigênio dissolvido ($6,47 \pm 1,46$ mg L⁻¹) e a temperatura ($22,9 \pm 0,16$ °C) da água foram medidos com um aparelho multiparâmetros YSI 85. O pH ($7,11 \pm 0,29$ unidade) foi monitorado com um pHmetro digital Quimis Q-400. A dureza da água ($32,83 \pm 0,09$ mg CaCO₃ L⁻¹) foi medida por titulação conforme APHA (1998).

Os juvenis I foram colocados em 15 aquários de 2 L, durante um tempo de exposição de 10 minutos, em seguida foram transferidos para recuperação por mais uma hora em aquários de vidro de 30 L contendo 25 L de água, com sistema de aeração constante.

O produto utilizado no teste de toxicidade aguda foi o eugenol, substância sintetizada a partir do óleo de cravo diluído a uma concentração de 1 mL:10 mL de etanol, 95 % para o preparo da solução mãe. O eugenol foi testado em cinco concentrações estabelecidas em testes preliminares. As diluições utilizadas foram respectivamente 50, 60, 70, 80, 90 mg L⁻¹ e o grupo controle. Resaltando que cada concentração apresentava três réplicas. Para cada repetição, foram utilizados cinco peixes ($n = 5$), totalizando 75 peixes.

Após 10 minutos de exposição ao eugenol, os peixes eram removidos para os aquários de recuperação. Sendo avaliadas apenas as mortalidades. Os juvenis I foram considerados mortos quando não reagiram mesmo após 1 hora de recuperação. Os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Para a análise estatística do efeito da concentração do eugenol sobre os peixes, a média dos valores encontrados foi comparada por meio de análise de variância (ANOVA critério único) e, com a indicação de valores significativos em nível de 5 %.

A determinação da CL_{50} foi efetuada mediante a utilização do programa computacional Trimmed Spearman-Kärber Method (versão 1.5). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo cada aquário uma repetição.

II – Resultados e discussão

Da mesma forma que visualizado por Vidal e colaboradores (2007) durante a realização dos bioensaios, o primeiro contato do eugenol com os peixes foi crucial. Em todos os tratamentos, os peixes juvenis I apresentaram reação de hiperatividade quando expostos ao eugenol, evidenciada pela rápida movimentação no aquário, que diminuía à medida que o efeito do anestésico se instalava. Em todas as concentrações, os peixes atingiram o padrão comportamental esperado na indução anestésica.

A hiperatividade observada, neste estudo, também foi relatada por Vidal et al. (2007), Grush et al. (2004) e Vidal et al. (2006). De acordo com Collins (1978), a euforia é o primeiro comportamento observado em um animal submetido à exposição de anestésicos.

Diversos autores constataram redução no tempo necessário para a anestesia de peixes à medida que se elevou a concentração (INOUE et al., 2003; VIDAL et al., 2006). Foi observado também que, ao aumentar a dose de anestésicos maior era a influência na mortalidade dos peixes, o que ficou evidenciado no presente estudo, comprovando, assim, o efeito tóxico em elevadas concentrações. De acordo com a Tabela 1, quanto maior a concentração maior é o risco de mortalidades dos juvenis I expostos ao eugenol.

Como observado na Tabela 1, o bioensaio com a concentração de 50 mg L⁻¹ apresentou mortalidade significativa menor de peixes em relação as outras dosagens, isto indica que o efeito tóxico do eugenol a esta concentração é relativamente baixo para *Oreochromis niloticus*. Desta maneira, observa-se que o eugenol, de forma geral, atende aos critérios estabelecidos para um bom anestésico por Ross e Ross (1999).

TABELA 1 Mortalidade de tilápias expostas ao eugenol em diferentes concentrações (mg L⁻¹) durante 10 minutos. Os dados estão expressos em média ± erro padrão

| Concentração (mg L ⁻¹) | Mortalidade (%) | | | |
|------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|----------------------------|
| | Repetição 1 | Repetição 2 | Repetição 3 | Média±EP |
| Controle | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 50 | 20 | 0 | 0 | 6,67± 6,67 ^a |
| 60 | 20 | 0 | 20 | 13,33± 6,67 ^b |
| 70 | 60 | 20 | 60 | 46,67± 13,33 ^{ab} |
| 80 | 80 | 40 | 100 | 73,33± 17,63 ^b |
| 90 | 100 | 60 | 80 | 80,00± 11,55 ^b |

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa por uma ANOVA e test-Tukey (p<0,05)

Até o momento, não foram encontrados traços tóxicos do eugenol em animais aquáticos previamente expostos a ele, além do fato de que outras áreas como: a odontologia, a indústria de alimentos e a fabricação de perfumes têm vasto uso do produto para humanos, sem a constatação de riscos, inclusive ambientais (BARBOSA et al. 2007). Porém, a depender da dose e do tempo de exposição utilizados, o próprio anestésico pode ser prejudicial aos peixes, com a observação de consequências maléficas a saúde do animal, podendo levar até mesmo a morte instantânea por superdosagem e/ou recuperação inadequada à anestesia.

O Gráfico 1 apresenta a mortalidade estimada de juvenis I de *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações de eugenol. Após 10 minutos de exposição ao anestésico, a CL_{50} estimada foi de 71,68 mg L⁻¹. Vidal et al. (2007) relatam que na concentração de 25 mg L⁻¹, mesmo após 10 minutos de exposição ao anestésico, alguns peixes não atingiram a anestesia profunda. Tal fato foi constatado pela resposta a estímulos externos.

Todas as concentrações de eugenol alteraram o comportamento dos peixes e foram capazes de conduzi-los ao parâmetro comportamental definido para a indução anestésica. Observou-se redução do tempo necessário para indução e aumento do tempo de recuperação à medida que a concentração foi elevada. De acordo com Vidal (2007), para o procedimento de manejo realizado durante o experimento com piauçu (*Leporinus macrocephalus*), as melhores concentrações seriam 37,5 e 50 mg L⁻¹, por apresentarem tempos de indução e recuperação satisfatórios.

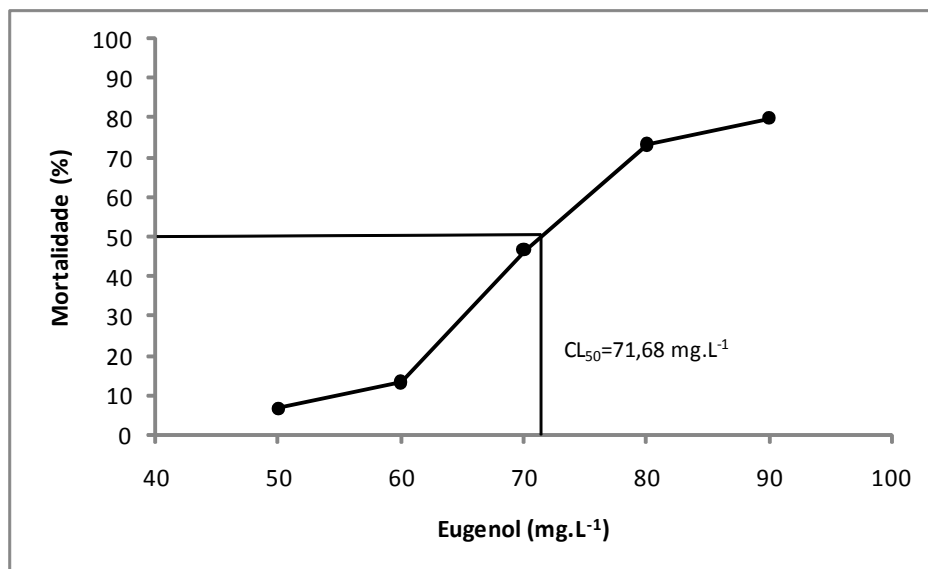
III – Considerações finais

O eugenol se mostrou eficiente como substância anestésica para juvenis I de tilápia. Todas as concentrações foram capazes de induzir a anestesia profunda em cerca de poucos minutos, sendo que aumento da dose de anestésico influencia na mortalidade dos peixes, o que ficou evidenciado no presente estudo, comprovando, assim, o efeito tóxico em elevadas concentrações. A CL_{50} estimada (71,68 mg L⁻¹) é satisfatória possibilitando boa margem de segurança ao anestésico.

Referências bibliográficas

APHA, (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18. ed. New York: American Public Health Association, 1998.

GRÁFICO 1 Mortalidade de juvenis I de tilápia após 10 minutos de exposição em diferentes concentrações de eugenol



ARRUDA, Lia Ferraz de. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), São Paulo, 2004.

BARBOSA, L. G.; MORAES, G.; INOUE, L. A. K. A. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 255-260, jul./set. 2007.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E.C. Stress e crescimento de peixes em piscicultura intensiva. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1999. p. 25-40.

COLLINS, V. J. **Princípios de anestesiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

CUNHA, M. A. **Tempo de indução e recuperação anestésica em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, jan./mar. 2005.

FAO (Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação). **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma: FAO, 2002.

GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v.1, p. 46-53, 2004.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais renováveis. **Estatística da pesca 2001, Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Tamandaré: Ibama, 2003.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, Santa Maria, n. 5, v. 33, p. 943-947, set./out.2003.

NOGUEIRA, A. J. Aspectos da biologia reprodutiva e padrões de crescimento da tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus). 1758 em cultivos experimentais. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v.1, n. 1, p. 1-77, agosto de 2003.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Blackwell Science; Oxford, 1999.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Blackwell Publishing Ltda., p. 1-6, 2005.

SPRAGUE, J. B. 1990. Aquatic Toxicology. In: Schrech, C. B.; Moyle, P. B. (Eds.). **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland, USA: American Fisheries Society, 1990.

VIDAL, L. V. O. et al. Utilização do Eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 275-279, jul./set. 2006.

VIDAL, L. V. O. et al. Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 357-362, out./dez. 2007.