

## Notas Científicas

### Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína

Santiago Benites de Pádua<sup>(1)</sup>, José Dias Neto<sup>(1)</sup>, Róberson Sakabe<sup>(1)</sup>, Gustavo da Silva Claudiano<sup>(2)</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>(3)</sup> e Fabiana Pilarski<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/nº, Bairro Rural, CEP 14870-000 Jaboticabal, SP. E-mail: santiagopadua@live.com, jdias@veterinario.med.br, rsakabe@yahoo.com.br, fabianap@caunesp.unesp.br <sup>(2)</sup>Unesp, Departamento de Patologia Animal. E-mail: claudianovet@yahoo.com.br <sup>(3)</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-10, Km 29, CEP 69010-970 Manaus, AM. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anestésico de óleo de cravo e benzocaína sobre os parâmetros hematológicas e a fragilidade osmótica dos eritrócitos em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Trinta peixes adultos foram avaliados em três tratamentos: controle, sem anestesia; anestesia com óleo de cravo a 50 mg L<sup>-1</sup>; e anestesia com benzocaína a 100 mg L<sup>-1</sup>. O sangue dos peixes foi coletado para a determinação do hemograma, e o teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos foi aplicado. As doses utilizadas de óleo de cravo e benzocaína não são adequadas para estudos hematológicos, para estabelecer valores de referência em tambaquis, pois causam alterações expressivas dos parâmetros hematológicos, tais como leucocitose e hemólise iatrogênica.

Termos para indexação: *Colossoma macropomum*, *Syzygium aromaticum*, hematologia, fragilidade de eritrócitos, peixe nativo.

### Hematologic variables in tambaquis anesthetized with clove oil and benzocaine

Abstract – The objective of this work was to evaluate the anesthetic effect of clove oil and benzocaine on the hematology and osmotic fragility of erythrocytes in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Thirty adult fish were evaluated in three treatments: a control, without anesthetic; anesthesia with clove oil at 50 mg L<sup>-1</sup>; and anesthesia with benzocaine at 100 mg L<sup>-1</sup>. Blood was collected for hemogram determination, and a test for the erythrocyte osmotic-fragility was applied. The utilized doses of clove oil and benzocaine are not appropriate for hematologic studies to establish reference values for tambaqui because they cause significant changes of the hematologic parameters, such as leukocytosis and iatrogenic hemolysis.

Index terms: *Colossoma macropomum*, *Syzygium aromaticum*, hematology, fragility of erythrocytes, native fish.

A utilização de anestésicos em peixes tem sido amplamente empregada durante o manejo, como método para garantir a integridade dos animais contra danos e facilitar sua manipulação (Velíšek et al., 2005).

Entre os fármacos mais utilizados em peixes, destacam-se a benzocaína (Delbon & Paiva, 2012) e o óleo de cravo (Velíšek et al., 2005). Entretanto, o efeito de diferentes anestésicos sobre os parâmetros fisiológicos dos peixes são variados, dependem de sua farmacocinética e farmacodinâmica, e de onde e quando são administrados. Sabe-se que, em banho de imersão, como anestesia inalatória, estes afetam o sistema nervoso dos peixes e causam depressão central ou bloqueio da condução do impulso nervoso, com

consequente bloqueio da percepção dos estímulos externos, além de proporcionar analgesia.

Os teleósteos apresentam sistema nociceptivo semelhante aos dos demais vertebrados e, possivelmente, são capazes de captar e conduzir estímulos (Sneddon, 2004). Assim, vários anestésicos têm sido utilizados para a contenção química, durante procedimentos de coleta sanguínea, para evitar alterações nos parâmetros durante o processo (Ishikawa et al., 2010). No entanto, estes fármacos podem causar uma série de alterações nos parâmetros fisiológicos, e a precisão do exame hematológico pode ser reduzida. Portanto, é necessário o conhecimento dessas alterações em diferentes espécies de peixes, já

que elas podem ser específicas à espécie, além daquelas relacionadas à farmacocinética de cada anestésico e sua posologia.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anestésico de óleo de cravo [*Syzygium aromaticum* (L.) Merril & Perry] e benzocaína sobre os parâmetros hematológicos e a fragilidade osmótica dos eritrócitos em tambaqui (*Colossoma macropomum*).

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Foram utilizados 30 tambaquis (357,5±94,5 g), acondicionados em três caixas de fibra (300 L), abastecidas com água de poço artesiano com vazão de 1,5 L min<sup>-1</sup> e aeração. Os peixes foram alimentados com ração comercial (3% da biomassa, 28% de PB e 4.000 kcal kg<sup>-1</sup> de EB) durante 30 dias. A qualidade da água permaneceu na faixa adequada ao conforto dos peixes: oxigênio dissolvido = 5,9±0,4 mg L<sup>-1</sup>; temperatura = 29,6±0,4 °C; pH = 8,1 ± 0,1; alcalinidade = 192,5±1,4 mg L<sup>-1</sup>; amônia total = 0,1±0,004 mg L<sup>-1</sup>.

Os grupos (n=10) foram distribuídos aleatoriamente em delineamento inteiramente casualizado, e cada animal representou uma unidade experimental, conforme a seguir: G1, anestesia com óleo de cravo à concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> (EUG); G2, anestesia com benzocaína à concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> (BEM); G3, sem anestesia (controle). Para a indução anestésica, foram utilizados recipientes de plástico (20 L), em que os peixes foram mantidos até atingir o quarto estágio de anestesia (Woody et al., 2002), e o grupo-controle foi contido mecanicamente (< 30 s).

Após a indução, foi feita a colheita de 2 mL de sangue por peixe, com seringas heparinizadas (100 UI). A partir destas amostras, foram determinados o percentual de hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), a taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (Collier, 1944) e a contagem de eritrócitos em alíquota de sangue diluída a 1:200 em solução de formol-citrato e contagem em hemocítmetro. Com esses dados, foram calculados os índices hematimétricos compreendidos como o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (Chcm) (Wintrobe, 1934). As extensões sanguíneas foram confeccionadas, coradas e analisadas em microscópio óptico comum (Tavares-Dias et al., 2008).

Para a determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos, uma alíquota do sangue foi misturada a uma solução salina tamponada (pH 7,4), e diluições em série foram realizadas a partir da solução-estoque a 10,5%, nas seguintes concentrações: 0,65, 0,54, 0,43, 0,32, 0,2 e 0,10% de NaCl-PO<sub>4</sub> (Ishikawa et al., 2010).

Todos os procedimentos foram adotados de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/Unesp), protocolo nº 013985/09.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

As duas substâncias utilizadas como anestésicos para o tambaqui foram capazes de abolir as reações à manipulação e à coleta de material, mesmo com os peixes fora da água. Entretanto, houve diferença nas variáveis analisadas. Nos peixes anestesiados com benzocaína, observou-se redução do número de eritrócitos e da Chcm, com aumento do VCM (Tabela 1). Do mesmo modo, nos peixes anestesiados com óleo de cravo, verificou-se redução da concentração de hemoglobina e do Chcm, com aumento do VCM. No teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos, quando os peixes foram expostos aos fármacos, observou-se aumento do percentual de hemólise, em comparação ao grupo controle, e os valores de hemólise mais altos ocorreram nos peixes anestesiados com benzocaína (Figura 1).

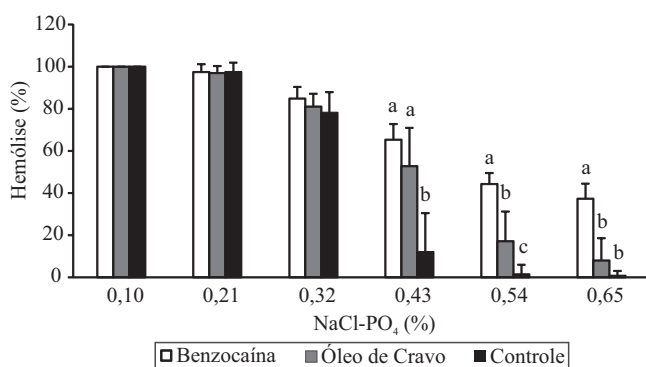
**Tabela 1.** Valores médios±desvios padrão dos parâmetros hematológicos de tambaquis (*Colossoma macropomum*) anestesiados com óleo de cravo e benzocaína<sup>(1)</sup>.

Parâmetro hematológico	Controle	Óleo de cravo	Benzocaína
Trombócito (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	39,2±15,6a	37,8±12,5a	57,8±8,1b
Leucócito (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	32,2±6,1a	54,8±17,1b	62,7±13,6b
Linfócito (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	23,1±6,4a	43,6±15,4b	50,8±11,4b
Monócito (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	1,5±0,9a	2,2±3,1a	2,6±2,4a
Eosinófilo (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,04±0,09a	0,1±0,3a	0,09±0,2a
Neutrófilo (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	7,0±3,3a	7,5±7,8a	7,9±5,1a
LG <sup>(2)</sup> PAS positivo (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,7±0,7a	3,4±3,3b	1,3±2,3ab
Leucócito imaturo (×10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,01±0,04a	0,08±0,2a	0,1±0,1a
Hematócrito (%)	25,0±5,1a	27,3±6,2a	26,1±7,9a
Eritrócito (10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	1,8±0,8a	1,5±0,6ab	1,3±0,4b
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8,3±0,9a	6,4±1,6b	7,5±1,8ab
Volume corpuscular médio (fL)	160,7±10,9b	189,9±20,7a	190,7±25,8a
Hemoglobina corpuscular (g dL <sup>-1</sup> )	30,8±5,7a	23,9±9,3c	26,8±3,9b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Leucócito granular. N=10.

Apesar do baixo tempo de exposição dos peixes aos anestésicos, houve redução dos níveis de hemoglobina e da Chem, com aumento concomitante do VCM, o que induziu a um quadro hematológico semelhante ao de uma anemia macrocítica hipocrômica iatrogênica, que ocorre em mamíferos em decorrência dos efeitos adversos dos tratamentos alopáticos e de intoxicação por produtos químicos (Weiss et al., 2010).

Alterações no eritrograma de peixes sob efeito de diferentes anestésicos foram descritos em diversas espécies de teleósteos (Tort et al., 2002; Sudagara et al., 2009; Delbon & Paiva, 2012), com diferentes efeitos sobre os parâmetros hematológicos. Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), expostas ao eugenol apresentaram aumento nos valores dos eritrócitos e diminuição do Chem (Tort et al., 2002), fato que é corroborado pelos resultados do presente trabalho. A anestesia com benzocaína, a 28°C, causou aumento do hematócrito em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) (Delbon & Paiva, 2012), enquanto o pó de cravo induziu aumento do hematócrito, da hemoglobina e dos valores de eritrócitos em pardelha-dos-alpes (*Rutilus rutilus*) (Sudagara et al., 2009), resultados semelhantes aos do presente estudo. As alterações dos índices hematimétricos podem estar relacionadas ao aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos (Figura 1), em razão de distúrbio de permeabilidade da membrana destas células pelo uso dos anestésicos, como observado em estudos de espécies de peixes tropicais que evidenciaram as mesmas alterações (Tavares-Dias et al., 2008; Inoue et al., 2011).



**Figura 1.** Fragilidade osmótica dos eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A redução dos valores dos eritrócitos nos peixes expostos à benzocaína também pode ser atribuída à hemólise, pois essa condição foi observada desde as concentrações mais baixas, decorrentes, provavelmente, da farmacodinâmica deste fármaco, que bloqueia os canais de sódio, e da redução dos potenciais de ação da membrana (Holloway et al., 2004).

Alterações nos valores de trombócitos foram observadas somente nos peixes anestesiados com benzocaína (Tabela 1). Observou-se aumento do número de leucócitos totais, nos peixes submetidos aos dois anestésicos, bem como aumento dos valores de linfócitos. O óleo de cravo causou aumento destes valores e do número do leucócito granular PAS-positivo (LG-PAS), em comparação ao grupo-controle (Tabela 1), o que difere dos resultados observados em outras espécies de teleósteos (Velíšek et al., 2005; Sudagara et al., 2009).

A benzocaína não alterou os níveis de trombócitos e leucócitos em tilápia-do-nylo (Delbon & Paiva, 2012) e em pardelha-dos-alpes (Sudagara et al., 2009). Estas divergências encontradas na literatura, quando os mesmos fármacos foram utilizados, provavelmente, ocorreram em razão das diferentes espécies utilizadas nos ensaios e da metodologia empregada para determinação do trombograma e leucograma. Alguns estudos confirmam que a contagem total de leucócitos pelo método indireto proporciona resultados mais precisos em peixes (Tavares-Dias et al., 2008; Ishikawa et al., 2010). No método direto, recomendado por Natt & Herrick (1952) e Blaxhall & Daisley (1973), o fator de diluição, considerado elevado por alguns autores, faz com que os valores absolutos sejam inconsistentes (Tavares-Dias et al., 2008). Entretanto, os mesmos autores descreveram que problemas ocorrem com a coloração dos leucócitos e induzem a erros, uma vez que não é possível uma diferenciação segura entre leucócitos e trombócitos no hemocitômetro.

Agregação trombocitária e hemólise são os principais fatores que reduzem a precisão durante a realização do trombograma e leucograma, pelo método indireto, em peixes. A ocorrência de agregados de trombócitos nas extensões pode implicar valores altos ou baixos na contagem, pois, em alguns campos das extensões, é comum encontrar um grande número dessas células agrupadas e, em outros, ausência de trombócitos. Nessas condições, os trombócitos são depositados preferencialmente no final das extensões

sanguíneas, pelo fato de os agregados terem maior massa. Em situações de hemólise, como a provocada pelo uso de anestésicos no presente estudo, ocorre diminuição da relação entre eritrócitos e leucócitos e, portanto, os resultados da contagem total de leucócitos e trombócitos não representam uma condição hematológica real.

A anestesia com óleo de cravo e benzocaína causa alterações quantitativas nos parâmetros hematológicos em tambaqui, como leucocitose e hemólise iatrogênica, o que torna não adequado o uso destes fármacos, em estudos hematológicos que visam estabelecer valores de referência para o tambaqui.

### Agradecimentos

Ao Ministério da Pesca e Aquicultura, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e ao projeto 'Bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil (Aquabrazil)', pelo suporte financeiro.

### Referências

- BLAXHALL, P.C.; DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v.5, p.771-781, 1973. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x.
- COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, p.550-552, 1944.
- DELBON, M.C.; PAIVA, M.J.T.R. Eugenol em juvenis de tilápia-do-nilo: concentrações e administrações sucessivas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, p.43-52, 2012.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.
- HOLLOWAY, A.C.; KEENE, J.L.; NOAKES, D.G.; MOCCIA, R.D. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, v.35, p.1025-1030, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01108.x.
- INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, P.T.; SILVA, A.M.D. da; AFFONSO, E.G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v.41, p.327-332, 2011. DOI: 10.1590/S0044-59672011000200020.
- ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; PIETRO, P.S. de; HISANO, H. **Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. 8p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 17).
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v.31, p.735-738, 1952. DOI: 10.3382/ps.0310735.
- SNEDDON, L.U. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. **Brain Research Reviews**, v.46, p.123-130, 2004. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.007.
- SUDAGARA, M.; MOHAMMADIZAREJABADA, A.; MAZANDARANIA, R.; POORALIMOTLAGHA, S. The efficacy of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). **Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition**, v.1, p.1-5, 2009.
- TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A.A.; MARCON, J.L. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): an analysis and discussion. **Acta Amazonica**, v.38, p.351-356, 2008. DOI: 10.1590/S0044-59672008000200020.
- TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v.33, p.907-910, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2109.2002.00741.x.
- VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJCHALOVA, L. Effects of clove oil on anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L). **Veterinárni Medicina**, v.50, p.269-275, 2005.
- WEISS, D.J.; WARDROP, J.; SCHALM, O.W. **Veterinary hematology**. 6<sup>th</sup> ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. 1206p.
- WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.340-347, 2002. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb00284.x.

Recebido em 31 de julho de 2011 e aprovado em 22 de julho de 2013