

JHENEZE GUIMARÃES PEREIRA ROCHA

**TRANSPORTE DE MACHOS ADULTOS DE *Betta splendens* SEDADOS COM ÓLEO
DE CRAVO, *Syzygium aromaticum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon

Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro

Pollyanna de Moraes França
Ferreira

**VIÇOSA– MINAS GERAIS
2019**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R672t
2019
Rocha, Jheneze Guimarães Pereira, 1993-
Transporte de machos adultos de *Betta splendens* sedados
com óleo de cravo, *Syzygium aromaticum* / Jheneze Guimarães
Pereira Rocha. – Viçosa, MG, 2019.
48 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-46.

1. Anestésicos. 2. Comportamento agonístico. 3. Eugenol.
4. Peixes ornamentais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Mestrado em Biologia
Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 639.34

JHENEZE GUIMARÃES PEREIRA ROCHA

**TRANSPORTE DE MACHOS ADULTOS DE *Betta splendens* SEDADOS COM ÓLEO
DE CRAVO, *Syzygium aromaticum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de agosto de 2019

Jheneze Guimarães Pereira Rocha
Autora

Jener Alexandre Sampaio Zuanon
Orientador

*Dedico este trabalho em primeiro lugar aos meus pais, **Maria Imaculada Vidigal Guimarães** e **Nilson Pereira Rocha** (in memorian) e a meu irmão **Gladsdavid Guimarães Pereira Rocha** (in memorian). Agradeço pelos ensinamentos, valores e todo amor recebido. Por toda a contribuição de vocês no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por tudo!*

*Ao meu orientador, **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, pela paciência, ensinamentos, conversas e todo o tempo dedicado à minha formação!*

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Viçosa** e ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, pela dedicação, esforço, disponibilidade, carinho, paciência e por confiar no meu trabalho. Te admiro demais, principalmente por ser uma pessoa humilde e cheia de compaixão, buscando sempre o melhor das pessoas e se esforçando para que tudo esteja em harmonia. Obrigado pelos ensinamentos e por sua orientação, não somente no mestrado, mas por situações além. Você sempre estará em meu coração. Gratidão!

Às minhas coorientadoras **Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Salaro** e **Dr^ª. Pollyanna de Moraes França Ferreira**, pela disponibilidade e conselhos para que meu trabalho não fosse tão dispendioso.

Aos piscicultores do município de Patrocínio do Muriaé, **Gabriel Miranda Batista** e **Ronaldo Vilela Ávila**, pelo esforço para que esse trabalho fosse feito com grande sucesso. Principalmente pela doação dos animais para o estudo.

Ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal-LEQ (UFV), principalmente à **Prof^ª. Dr^ª. Mariella Bontempo Duca de Freitas**, por ajudar e aconselhar sobre as análises. A **Ms^a. Ana Luiza Fonseca Destro** e às alunas **Renata Maria Pereira de Freitas** e **Stella Bicalho Silva**, por toda ajuda, conversas e descontrações, fazendo com que fosse mais tranquilo o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Leandro Licursi de Oliveira**, do Laboratório Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Geral (UFV) e à aluna **Palloma Porto Almeida**, por terem dedicado tempo a me ajudar com análises.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP), **Maria Tatiana Soares Martins**, **Felipe Martins dos Santos**, **Juliana Rodrigues Gomes**, **Karina Ventura Boechat Martins**, **Filipe Silveira Azevedo**, **Caio William Magalhães Souza**, **Daniele Gomes dos Santos**, **Alisson Luiz Martins Duarte**, **Gabriel França Silva** e **Isabelle Pinheiro Siqueira**, e aos que já foram colegas de laboratório e têm o LAFAP no coração, **Débora Werneck Caldas**, **Wanderson Valente dos Santos**, **Alex Júnio da Silva Cardoso**, **Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo Neves**, **Suellen Silva Condessa**, **Sendy Moreira Reis** e **Leandro Teixeira de Novaes**. Agradeço por toda a ajuda concedida, em todos os momentos,

desde os mais cansativos até os mais felizes. Vocês tornaram esse trabalho possível e me ajudaram a vivenciar de forma descontraída o mestrado.

À minha mãe, **Maria Imaculada Vidigal Guimarães**, por cada momento dedicado a meu crescimento, desenvolvimento e maturidade, e não medir esforços para que eu alcançasse meus sonhos. A senhora é uma guerreira, e merece todo o meu carinho e amor. Obrigada por tudo, mãe!

Às pessoas mais que especiais, **Mateus Alves Dos Santos, Priscila da Silva Maradini, Letícia Valadares Ballotin, Maíla Rodrigues Teixeira, Alex Felipe Ramos de Sousa, Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo Neves e Ludimila Angelina do Vale**. Vocês fizeram a minha vida mais alegre, me trouxeram mais paz e amor. Obrigada pelo carinho, pela amizade, por estarem do meu lado. Amo todos vocês!

Muito obrigada a todos!

“A mínima mudança em quase qualquer lugar é suficiente para mudar todo o resto da história.”

Richard Dawk

RESUMO

ROCHA, Jheneze Guimarães Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Transporte de machos adultos de *Betta splendens* sedados com óleo de cravo, *Syzygium aromaticum***. Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro e Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Peixes com comportamento territorialista, como os machos de betta, *Betta splendens*, são agressivos entre si e, portanto, precisam ser transportados individualmente para evitar lesões e perda por mortalidade. O transporte desses peixes é realizado sem a utilização de oxigênio puro em função da presença do órgão de respiração aérea, o que permite a utilização de pequenos sacos plásticos, com pequeno volume de água. Entretanto, os criadores de peixes ornamentais do município de Patrocínio do Muriaé, MG, têm relatado que a embalagem individual de machos de betta aumenta os custos em função da mão-de-obra e do número de embalagens utilizadas. Desta forma, a alternativa proposta pelos criadores seria o transporte desses peixes embalados coletivamente, com o uso de sedativo para redução da agressividade. A redução do número de embalagens plásticas também possibilitaria a diminuição da poluição ambiental. Dentre os sedativos com potencial para serem utilizados para esse propósito, o óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, destaca-se em função de sua propriedade miorrelaxante, podendo reduzir a atividade locomotora e o comportamento agonístico. Assim, objetivamos avaliar o transporte de machos adultos de betta embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo. Os peixes foram embalados individualmente (I) ou coletivamente (C), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo: I₀: sem sedativo; I₅: 5 mg L⁻¹; I₁₀: 10 mg L⁻¹; I₁₅: 15 mg L⁻¹; C₅: 5 mg L⁻¹; C₁₀: 10 mg L⁻¹ e C₁₅: 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo, por 48 h. Foram avaliados a taxa de sobrevivência, os danos corporais, as repostas de estresse, o estado oxidativo das brânquias e a qualidade de água. A concentração de 5 mg L⁻¹, em função baixa taxa de sobrevivência, e a de 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo, em função dos altos danos corporais, se mostraram inviáveis para sedação em transporte betta embalados coletivamente. A maior concentração de óleo de cravo avaliada (15 mg L⁻¹) apresentou alta taxa de sobrevivência, baixos danos corporais, menores respostas de estresse (glicose e cortisol) e menor excreção de amônia na água, o que indica a possibilidade do transporte de bettas embalados coletivamente. Entretanto, nessa concentração de óleo de cravo foram observados os maiores danos oxidativos (malondialdeído e proteína carbonilada) nas brânquias. Apesar da eficácia do óleo de cravo produzir sedação suficiente para redução da agressividade de machos de betta, e possibilita o transporte coletivo, porém, são necessários novos estudos para avaliar outros sedativos que não causem danos oxidativos.

Palavras-chave: Anestésico. Comportamento agonístico. Eugenol. Peixe ornamental.

ABSTRACT

ROCHA, Jheneze Guimarães Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019. **Transport of *Betta splendens* adult males sedated with clove oil, *Syzygium aromaticum*.** Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisers: Ana Lúcia Salaro and Pollyanna de Moraes França Ferreira

Fishes with territorial behavior, such as siamese fighting fish males, *Betta splendens*, are aggressive to each other and therefore need to be transported individually to avoid injury and loss of mortality. Air breathing allows these fish to be packaged for transport without the need for pure oxygen in small plastic bags with a small volume of water. However, ornamental fish breeders from the municipality of Patrocínio do Muriaé, MG have reported that individual packaging of Siamese fighting fish males increases costs due to labor and number of packages used. Thus, the alternative proposed by the breeders would be the transport of these collectively packaged fish, using sedatives to reduce aggressiveness. Reducing the number of plastic packaging would also make it possible to reduce environmental pollution. Among the sedatives with potential to be used for this purpose, clove oil, *Syzygium aromaticum*, stands out due to its myorelaxant property, which may reduce locomotor activity and agonistic behavior. Thus, we aimed to evaluate the possibility of transporting adult Siamese fighting fish males in the same package under sedation with clove oil. Fish were individually (I) or collectively (C) packed under different concentrations of clove oil: I₀: without sedative; I₅: 5 mg L⁻¹; I₁₀: 10 mg L⁻¹; I₁₅: 15 mg L⁻¹; C₅: 5 mg L⁻¹; C₁₀: 10 mg L⁻¹ and C₁₅: 15 mg L⁻¹ of clove oil for 48 h. Water quality, survival rate, body damage, oxidative state of gills and stress responses were evaluated. The concentration of 5 mg L⁻¹, due to low survival rate, and 10 mg L⁻¹ of clove oil, due to the high bodily damage, were not feasible for sedation in transport of collectively packaged Siamese fighting fish. The highest concentration of clove oil evaluated (15 mg L⁻¹) presented high survival rate, low body damage, lower stress responses (glucose and cortisol) and lower ammonia excretion in water, indicating the possibility of transport of collectively packaged Siamese fighting fish males. However, at this concentration of clove oil the highest oxidative damage (malondialdeído and proteína carbonilada) was observed in gills. Despite the effectiveness of clove oil produces sufficient sedation to reduce the aggressiveness of Siamese fighting fish, and allows for collective transport. However, but further studies are needed to evaluate other sedatives that do not cause oxidative damage.

Keywords: Anesthetic. Agonistic behavior. Eugenol. Ornamental fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagens de machos adultos de *Betta splendens* representando os níveis de danos corporais..... 20
- Figura 2.** Pedúnculo caudal de macho adulto de *Betta splendens* utilizado para as análises de cortisol..... 22
- Figura 3.** Efeito do óleo de cravo sobre o teor de cortisol (valores médios \pm desvio padrão, $y = 0,4673 + 0,5623x - 0,0384x^2$, $R^2 = 0,83$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 27
- Figura 4.** Efeito do óleo de cravo sobre o NO – óxido nítrico (valores médios \pm desvio padrão, $y = 72,798 + 5,633x$, $R^2 = 0,51$) de machos adultos *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 28
- Figura 5.** Efeito do óleo de cravo sobre o PC – proteína carbonilada (valores médios \pm desvio padrão, $y = 4,8788 + 2,2694x - 0,3062x^2 + 0,01198x^3$, $R^2 = 0,99$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 28
- Figura 6.** Efeito do óleo de cravo sobre o MDA – malondialdeído (valores médios \pm desvio padrão, $y = 0,146 - 0,0060x + 0,0006x^2$, $R^2 = 0,93$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 29
- Figura 7.** Efeito do óleo de cravo sobre a atividade da SOD – superóxido dismutase (valores médios \pm desvio padrão, $y = 0,90469 - 0,04103x + 0,003066x^2$, $R^2 = 0,85$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 29
- Figura 8.** Efeito do óleo de cravo sobre o pH (valores médios \pm desvio padrão, $y = 6,01983 - 0,0247x + 0,001767x^2$, $R^2 = 0,78$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 30
- Figura 9.** Efeito do óleo de cravo sobre a taxa de sobrevivência (valores médios \pm desvio padrão, $y = -110 + 33,99x - 1,33x^2$, $R^2 = 0,98$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 31
- Figura 10.** Efeito do óleo de cravo sobre os danos corporais (valores médios \pm desvio padrão, $y = 4,06645 - 0,17497x$, $R^2 = 0,58$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 32
- Figura 11.** Efeito do óleo de cravo no teor de glicose sanguínea (valores médios \pm desvio padrão, $y = 123,97 - 4,2415x$, $R^2 = 0,94$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 32
- Figura 12.** Efeito do óleo de cravo sobre MDA- malondialdeído (valores médios \pm desvio padrão, $y = 2,04 - 0,7x + 0,0642x^2$, $R^2 = 1$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 33

- Figura 13.** Efeito do óleo de cravo sobre PC- proteína carbonilada (valores médios \pm desvio padrão, $y = 7,3485 + 0,1841x$, $R^2 = 0,74$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 33
- Figura 14.** Efeito do óleo de cravo sobre o teor de oxigênio dissolvido (valores médios \pm desvio padrão, $y = 1,533 + 0,4953x - 0,02347x^2$, $R^2 = 0,76$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 34
- Figura 15.** Efeito do óleo de cravo sobre o pH (valores médios \pm desvio padrão, $y = 7,7625 - 0,2544x + 0,0099x^2$, $R^2 = 0,97$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 34
- Figura 16.** Efeito do óleo de cravo sobre a amônia não ionizada (valores médios \pm desvio padrão, $y = 0,0271 - 0,00103x$, $R^2 = 0,75$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo de cravo, fornecida pelo fabricante (WNF®)	18
Tabela 2. Classificação dos danos corporais em machos adultos de <i>Betta splendens</i>	19
Tabela 3. Valores médios das variáveis de respostas de estresse, antes e após o transporte, de machos adultos de <i>Betta splendens</i> embalados individualmente, sem óleo de cravo.....	25
Tabela 4. Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias, antes e após o transporte, de machos adultos de <i>Betta splendens</i> embalados individualmente, sem óleo de cravo.....	25
Tabela 5. Valores médios das variáveis de qualidade de água, antes e após o transporte, de machos adultos de <i>Betta splendens</i> embalados individualmente, sem óleo de cravo.....	25
Tabela 6. Valores médios dos danos corporais e da taxa de sobrevivência de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	26
Tabela 7. Valores médios das respostas de estresse de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	27
Tabela 8. Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	28
Tabela 9. Valores médios das variáveis de qualidade de água de transporte de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	30
Tabela 10. Valores médios dos danos corporais e da taxa de sobrevivência de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	31
Tabela 11. Valores médios das respostas de estresse de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	32
Tabela 12. Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.....	33
Tabela 13. Valores médios das variáveis de qualidade de água de transporte de machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo.....	34

Sumário

Transporte de machos adultos de <i>Betta splendens</i> sedados com óleo de cravo, <i>Syzygium aromaticum</i>	13
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Animais e condições experimentais.....	17
2.2 Variáveis analisadas.....	19
2.2.1 Taxa de sobrevivência e danos corporais.....	19
2.2.2 Resposta de estresse.....	21
2.2.3 Estado oxidativo.....	22
2.2.4 Qualidade de água.....	24
2.2.5 Análise estatística.....	24
3. RESULTADOS	25
3.1 Efeito do transporte em machos adultos de <i>Betta splendens</i> embalados individualmente, sem óleo de cravo	25
3.2 Efeito do óleo de cravo em machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados individualmente, durante o transporte	26
3.3 Efeito do óleo de cravo em machos adultos de <i>Betta splendens</i> , embalados coletivamente, durante o transporte	31
4. DISCUSSÃO	36
5. REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO	47

Transporte de machos adultos de *Betta splendens* sedados com óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*

1

RESUMO

2 Com o objetivo de avaliar o transporte de machos adultos de *Betta splendens* embalados
3 coletivamente e sedados com óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, os peixes foram embalados
4 individualmente (I) ou coletivamente (C), submetidos a diferentes concentrações de óleo de
5 cravo: I₀: sem sedativo; I₅: 5 mg L⁻¹; I₁₀: 10 mg L⁻¹; I₁₅: 15 mg L⁻¹; C₅: 5 mg L⁻¹; C₁₀: 10 mg L⁻¹
6 e C₁₅: 15 mg L⁻¹. A concentração de 5 mg L⁻¹, em função baixa taxa de sobrevivência, e a de
7 10 mg L⁻¹, em função dos altos danos corporais, mostraram-se inviáveis. A maior concentração
8 de óleo de cravo avaliada (15 mg L⁻¹) apresentou alta taxa de sobrevivência, baixos danos
9 corporais, menores respostas de estresse (glicose e cortisol) e menor excreção de amônia na
10 água, o que indica a possibilidade do transporte de bettas embalados coletivamente. Entretanto,
11 nessa concentração de óleo de cravo, foram observados os maiores danos oxidativos nas
12 brânquias dos peixes, provavelmente em função de seu efeito irritante. Apesar da eficácia do
13 óleo de cravo possibilitar o transporte coletivo de bettas, são necessários novos estudos para
14 avaliar outros sedativos que não causem danos oxidativos.

15 **Palavras-chave:** anestésico, comportamento agonístico, eugenol, peixe ornamental

1. INTRODUÇÃO

No processo de produção de peixes, o transporte é necessário para o suprimento do mercado de iscas vivas, alevinos para povoamento de viveiros, matrizes para programas de reprodução e comercialização de peixes ornamentais. Os peixes podem ser acondicionados em sacos plásticos ou caixas (*transfish*), de forma individual ou em grupo (Lim, Dhert, & Sorgeloos, 2003; Sampaio & Freire, 2016). O tipo de transporte é influenciado pela duração, tamanho dos peixes, densidade de estocagem e temperatura da água (Braun & Nuñez, 2014; Sampaio & Freire, 2016). As características da espécie, como tolerância ao estresse e às variações na qualidade da água, presença de respiração aérea acessória e comportamento agonístico também influenciam o tipo de transporte (Lim et al. 2003; Pramod, Ramachandran, Sajeevan, Thampy & Pai, 2010; Sampaio & Freire, 2016). Peixes com comportamento territorialista, como os machos de betta, *Betta splendens*, são agressivos entre si (Monvises, Nuangsaeng, Sriwattanothai & Panijpan, 2009) e, portanto, precisam ser transportados individualmente para evitar lesões, que reduzem seu valor de mercado, e perda por mortalidade (Monticini, 2010).

O betta, também conhecido como peixe de briga, é uma das principais espécies comercializadas no mundo (Cardoso, Lana, Teixeira, Luz & Faria, 2012; Chapman, Fitz-Coy, Thunberg & Adams, 1997; Monvises et al., 2009), com participação significativa nos valores estimados de exportação de peixes ornamentais, que variam de 800 milhões a 30 bilhões de dólares anualmente (Saxby, Adams, Snellgrove, Wilson & Sloman, 2010). Sua popularidade se deve à grande variedade de cores e formatos de nadadeiras, alta rusticidade e respiração aérea acessória, que permite sua manutenção em pequenos aquários sem aeração (Monvises et al., 2009; Thongprajukaew, Pettawee, Muangthong, Saekhow & Phromkunthong, 2019; Zuanon, Morais & Souza, 2016). A respiração aérea permite que esses peixes sejam embalados para transporte sem a necessidade de injeção de oxigênio. Portanto, os machos de betta podem ser acondicionados em sacos plásticos, com pequeno volume de água, onde o ar presente fornece oxigênio suficiente. Entretanto, os criadores de peixes ornamentais do município de Patrocínio do Muriaé, MG, têm relatado que a embalagem individual de machos de bettas aumenta os custos em função da mão-de-obra e do número de embalagens utilizadas. Desta forma, a alternativa proposta pelos criadores seria o transporte desses peixes embalados coletivamente, com o uso de sedativo para redução da agressividade. A redução do número de embalagens também contribuiria para a diminuição da poluição e degradação ambiental, uma vez que o plástico é um material de difícil decomposição (Gregory, 2009).

49 Dentre os sedativos com potencial para serem utilizados para esse propósito, o óleo de
50 cravo, *Syzygium aromaticum*, destaca-se em função de sua propriedade miorrelaxante
51 (Fujimoto et al., 2018), podendo reduzir a atividade locomotora e o comportamento agonístico.
52 Além disso, seu uso como sedativo é considerado seguro (Javahery, Nekoubin & Moradlu,
53 2012), apresenta efeito rápido (Detar & Mattingly, 2004; Sladky, Swanson, Stoskopf, Loomis
54 & Lewbart, 2001), baixo custo e boa disponibilidade no mercado (Javahery et al., 2012; Pereira-
55 da-Silva, Oliveira, Ribeiro & Coppola, 2009; Woody, Nelson & Ramstad, 2002), bem como
56 ação antimicrobiana (Karapinar, 1990; Siddiqui, Ettayebi, Haddad & Al-Ahdal, 1996;
57 Stecchini, Sarais & Giavedoni, 1993), antioxidante (Cortés-Rojas, de Souza, & Oliveira, 2014;
58 Gülçin, Elmastaş & Aboul-Enein, 2012) e analgésica (Sahin, Eulenburg, Heinlein, Villmann &
59 Pischetsrieder, 2017). O principal princípio ativo do óleo de cravo é o eugenol (70 a 95 %)
60 (Keene, Noakes, Moccia & Soto, 1998; Mazzafera, 2003), um depressor do sistema nervoso
61 central (Anderson, McKinley & Colavecchia, 1997). A meia vida do eugenol no sangue é curta,
62 sendo excretado completamente em 24 horas, o que permite a rápida recuperação dos peixes da
63 sedação/anestesia (Fischer, Von Unruh & Dengler, 1990; Woody et al., 2002). Assim,
64 objetivamos avaliar o transporte de machos adultos de *B. splendens* embalados coletivamente
65 e sedados com óleo de cravo.

66 2. MATERIAL E MÉTODOS

67 2.1 Animais e condições experimentais

68 O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
69 da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), protocolo nº 025/2019 (Anexo). Utilizou-
70 se delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos e quatro repetições. Os
71 peixes foram embalados individualmente (I) ou coletivamente (C), submetidos a diferentes
72 concentrações de óleo de cravo: I₀: peixes embalados individualmente, sem sedativo; I₅: peixes
73 embalados individualmente com 5 mg L⁻¹; I₁₀: peixes embalados individualmente com 10 mg
74 L⁻¹; I₁₅: peixes embalados individualmente com 15 mg L⁻¹; C₅: peixes embalados coletivamente
75 com 5 mg L⁻¹; C₁₀: peixes embalados coletivamente com 10 mg L⁻¹ e C₁₅: peixes embalados
76 coletivamente com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Em todos os tratamentos foi mantida a densidade
77 de estocagem (1 peixe 0,08 L⁻¹) utilizada na comercialização e transporte de machos de betta
78 pelos criadores de Patrocínio do Muriaé, MG. As concentrações de óleo de cravo foram
79 determinadas com base nos resultados obtidos por Pattanasiri, Taparhudee, & Suppakul (2017).

80 Nas embalagens individuais, cada peixe foi acondicionado em sacos plásticos de 10 x
81 13 cm, contendo 0,08 L de água e aproximadamente o dobro desse volume de ar. Nas
82 embalagens coletivas, foram acondicionados 15 peixes por saco plástico de 35 x 45 cm,
83 contendo 1,2 L de água e aproximadamente o dobro desse volume de ar. Tanto nas embalagens
84 individuais como nas coletivas, cada unidade experimental foi caracterizada pela presença de
85 15 peixes. No caso dos peixes embalados individualmente, 15 sacos de 10 x 13 cm foram
86 agrupados em um saco plásticos de 35 x 45 cm.

87 Com intuito de evitar confrontos agonísticos antes do início do transporte, os peixes
88 embalados coletivamente foram pré-anestesiados com óleo de cravo na concentração de 100
89 mg L⁻¹ (Pattanasiri et al., 2017) até atingirem o estágio 3 de anestesia, segundo Woody et al.
90 (2002), caracterizado pela completa perda de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição
91 vertical. Os peixes embalados individualmente foram coletados nos tanques e transferidos
92 diretamente para as embalagens contendo as diferentes concentrações de óleo de cravo.

93 Machos adultos de bettas, com peso médio de 1,50 ± 0,16 g, foram coletados nos tanques
94 em uma criação comercial no município de Patrocínio do Muriaé, MG (Piscicultura AQUACEL
95 PEIXES ORNAMENTAIS) e imediatamente submetidos ao transporte.

96 Para obtenção das concentrações desejadas, foi preparada uma solução estoque de óleo
97 de cravo (WNF Ind. e Com. LTDA) em álcool etílico absoluto (1:10 v/v). Com base na
98 densidade do óleo de cravo (0,973 mg mL⁻¹), foram calculados os volumes a serem utilizados

99 para obtenção das concentrações de 5; 10 e 15 mg L⁻¹, que equivalem a 4,14; 8,28 e 12,43 mg
 100 L⁻¹ de eugenol. O óleo de cravo utilizado apresentou, segundo o fabricante (WNF[®]), 82,83 %
 101 de eugenol, 12,67 % de β-cariofileno, 1,46 % de α-cariofileno, 0,95 % de acetileugenol e 0,41
 102 % de metileugenol (Tabela 1).

103 **Tabela 1.** Composição química do óleo de cravo, fornecida pelo fabricante (WNF[®])

Constituinte	Concentração (%)
Eugenol	82,83
β-cariofileno	12,67
α-cariofileno	1,46
Acetileugenol	0,95
Metileugenol	0,41
Não identificado	1,68

104 Método de análise: cromatografia gasosa de alta resolução. Detector FID1A.

105 Os peixes foram mantidos no porta-malas de um automóvel durante 48 h, alternando
 106 períodos em movimento e parado (Ferreira et al., 2017). Após esse período, as embalagens
 107 foram transferidas para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura – Departamento de
 108 Biologia Animal – UFV. Para a coleta das amostras, os peixes foram eutanasiados por secção
 109 medular seguida de decapitação por meio da utilização de tesoura cirúrgica. A confirmação da
 110 morte foi realizada por meio da ausência de resposta dos peixes mediante aplicação de estímulo
 111 mecânico com bastão de vidro.

112 **2.2 Variáveis analisadas**

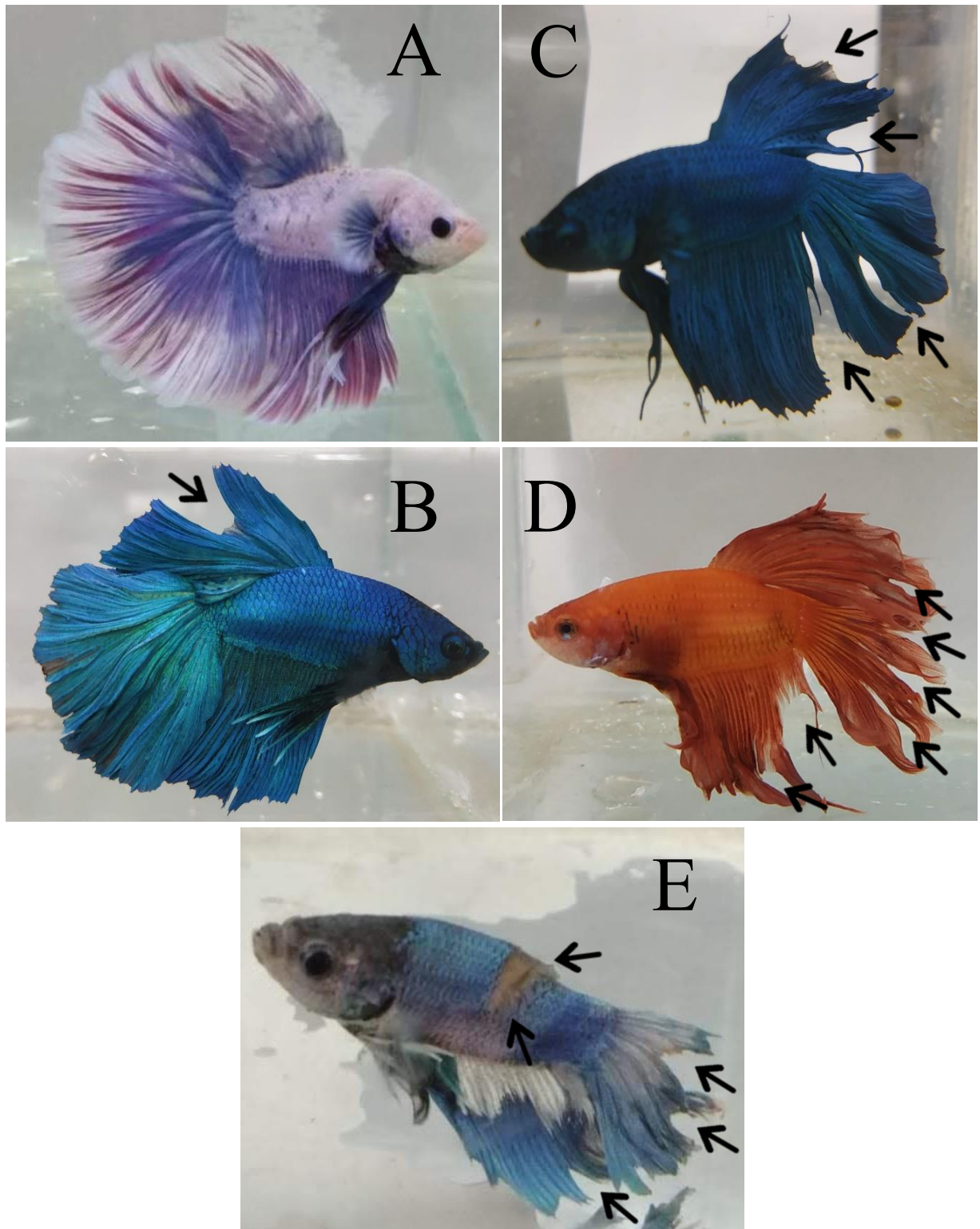
113 **2.2.1 Taxa de sobrevivência e danos corporais**

114 Ao final do período experimental, os peixes foram contados para avaliação da taxa de
 115 sobrevivência e, em seguida, transferidos para um aquário de vidro com 1 L de água, sem óleo
 116 de cravo, onde foram classificados os danos corporais, com base na integridade das escamas e
 117 nadadeiras. Foram avaliados 5 peixes/unidade experimental, sendo classificados de 1 a 5, por
 118 um único observador, com base nos critérios apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 1.

119 **Tabela 2.** Classificação dos danos corporais em machos adultos de *Betta splendens*

Classificação	Danos corporais
1	Escamas e nadadeiras íntegras
2	Pequenos danos em apenas uma das nadadeiras
3	Danos parciais em mais de uma nadadeira
4	Amplos danos em mais de uma nadadeira e escamas
5	Escamas e nadadeiras completamente danificadas

120 Obs: Os peixes com classificação igual ou maior que 3 foram considerados impróprios para
 121 comercialização.



122 **Figura 1.** Imagens de machos adultos de *Betta splendens* representando os níveis de danos
 123 corporais. As setas indicam danos nas nadadeiras e/ou escamas A) Classificação 1 – Escamas
 124 e nadadeiras íntegras; B) Classificação 2 – Pequenos danos em apenas uma das nadadeiras; C)
 125 Classificação 3 – Danos parciais em mais de uma nadadeira; D) Classificação 4 – Amplos danos
 126 em mais de uma nadadeira e escamas; E) Classificação 5 – Escamas e nadadeiras
 127 completamente danificadas. Foto: Jheneze Rocha.

128 2.2.2 Resposta de estresse

129 Para avaliar as respostas de estresse, foram mensurados glicose e lactato sanguíneos e o
130 cortisol no pedúnculo caudal. Foram utilizados seis peixes antes do transporte, e três por
131 repetição (12 peixes por tratamento) após o transporte. O sangue foi coletado por meio de um
132 corte no pedúnculo caudal com bisturi e depositado em tiras reagentes do aparelho monitor
133 digital para leitura de glicose (Accu-Chek[®] Active Roche) e para leitura de lactato (Accutrend[®]
134 Plus Roche).

135 Para avaliar o teor de cortisol, os peixes foram congelados inteiros em nitrogênio líquido
136 e armazenados em freezer -80 °C. Posteriormente, os peixes foram descongelados e o
137 pedúnculo caudal (segmento corporal entre a extremidade posterior da nadadeira dorsal e a
138 extremidade anterior da nadadeira caudal, pesando cerca de 100 mg, Figura 2) foi coletado com
139 auxílio de um bisturi, seccionado e transferido para um microtubo com 1 mL de PBS (0,26 g
140 KH₂PO₄, 2,17 g Na₂HPO₄-7H₂O, 8,71 g NaCl, 1 L água destilada, pH 7,4), de acordo com
141 metodologia descrita por Guest, Blaylock & Evans (2016) adaptada. As amostras foram
142 processadas por 50 s utilizando o homogeneizador de tecidos (Tissue-Tearor) e, posteriormente,
143 acrescentado 1 mL de de PBS, pH 7,4. O homogenato foi transferido para um tubo Falcon com
144 tampa de rosca (15 mL), seguido de lavagem do microtubo com 2 mL de éter etílico, por cinco
145 vezes, obtendo-se volume final de 12 mL. O preparado foi homogeneizado em vortex durante
146 1 min, centrifugado a 2.000 g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido
147 utilizando pipeta Pasteur e transferido para tubo de ensaio. Ao pélete restante, foi adicionado
148 éter etílico até completar 12 mL, e novamente homogeneizado e centrifugado. Os sobrenadantes
149 das duas extrações foram unidos e secos em banho-maria a 40 °C. As amostras secas foram
150 reconstituídas em 500 mL de tampão Assay buffer (0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 0,1g PEG 4000,
151 1 nM EDTA, 100 mL água destilada), vedados com parafilme e armazenadas em refrigerador
152 por 12 h. Posteriormente, duplicatas das amostras, com volume de 25 µL foram retiradas e
153 utilizadas em poços, de acordo com o protocolo de ensaio fornecido pela Monobind Inc.
154 (Cortisol Test System, Monobind Inc. product code: 3625-300). As amostras foram
155 quantificadas usando um leitor de microplacas a 450 nm e expressas em µg g⁻¹.



156 **Figura 2.** Pedúnculo caudal de macho adulto de *Betta splendens* utilizado para as análises de
157 cortisol. O segmento corporal entre as linhas pontilhadas representa a parte do corpo que foi
158 seccionada entre a extremidade posterior da nadadeira dorsal e a extremidade anterior da
159 nadadeira caudal. Foto: Jheneze Rocha.

160 2.2.3 Estado oxidativo

161 Para avaliar o estado oxidativo das brânquias, foram realizadas análises da atividade das
162 enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e das concentrações de
163 malondialdeído (MDA), óxido nítrico (NO) e proteína carbonilada (PC), no Laboratório de
164 Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV.

165 As brânquias foram coletadas até a obtenção um pool de 200 mg por amostra. Para tanto,
166 foram utilizados seis peixes antes do transporte (duas repetições) e três por repetição após o
167 transporte (4 repetições por tratamento). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido
168 e armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

169 As amostras foram descongeladas e processadas utilizando homogeneizador de tecidos
170 (Tissue-Tearor) em 1,5 mL de solução tampão fosfato $0,2\text{ mol L}^{-1}$ contendo 1 mmol L^{-1} de ácido
171 etilenodiaminotetracético (EDTA), em pH 7,4, e centrifugadas a 9.000 g , a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min.
172 As análises da atividade das enzimas SOD e CAT e das concentrações de MDA e NO foram
173 realizadas no sobrenadante. Os péletes resultantes do homogenato foram utilizados para análise
174 da concentração da PC.

175 A atividade da SOD foi determinada com base na capacidade desta enzima de catalisar
176 a reação do radical superóxido (O_2^-) e, assim, diminuir a auto-oxidação do pirogalol (Dieterich,
177 Bielgk, Beulich, Hasenfuss & Prestle, 2000). A mistura da reação continha $99\text{ }\mu\text{L}$ de tampão
178 fosfato (5 mmol L^{-1} , pH 7,0), $6\text{ }\mu\text{L}$ de solução MTT (brometo de (3 - [4,5 - dimetiltiazol - 2H] -

179 2,5 - difeniltetrazolium, PM = 414,3) 1,25 mM e 30 μ L da amostra. Para iniciar a reação, foram
180 adicionados 15 μ L de pirogalol (100 μ mol L⁻¹) e mantido incubado a 37 °C por 5 min. Após
181 esse período, foram adicionados 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, PM= 78,13). A auto-
182 oxidação do pirogalol foi determinada em leitor de ELISA a 570 nm. A atividade da SOD foi
183 expressa em U SOD mg⁻¹ de tecido.

184 A atividade da CAT foi mensurada pelo método descrito por Aebi (1984), o qual utiliza
185 o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 %. O H₂O₂ 30 % foi diluído em tampão fosfato
186 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. A mistura da reação continha 990 μ L do substrato diluído e 10 μ L da
187 amostra. Antes da análise de cada amostra, foi realizada a leitura do branco, composto por 990
188 μ L de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0 e 10 μ L da amostra. O decréscimo do H₂O₂ foi
189 determinado em espectrofotômetro a 240 nm, durante 60 s, com intervalo de 30 s. A atividade
190 da CAT foi expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de tecido.

191 O MDA, principal produto da peroxidação lipídica, foi mensurado de acordo com Buege
192 & Aust (1978). A mistura da reação continha 0,2 mL de amostra e 0,4 mL de solução de ácido
193 tricloroacético (15 %), ácido tiobarbitúrico (0,375 %) e ácido clorídrico (0,6 %). A mistura foi
194 homogeneizada em vortex e mantida em banho-maria a 90 °C por 40 min. Após 5 min no gelo,
195 foi adicionado 0,6 mL de álcool isobutílico à solução, homogeneizado em vortex por 2 min e
196 centrifugado por 10 min, a 9.000 g, a 25 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a
197 concentração de MDA, em leitor de ELISA, a 535 nm. A concentração de MDA foi determinada
198 pela curva padrão de concentrações de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados
199 foram expressos em μ M MDA mg⁻¹ de tecido.

200 A concentração de PC foi medida com base nos grupos carbonil que reagem com o
201 reagente 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Levine, Williams, Stadtman, & Shacter, 1994). Os
202 péletes foram precipitados em solução tricloroacético (TCA) 10 % e a solução centrifugada a
203 9.000 g, por 10 min, a 15 °C. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao precipitado 0,5
204 mL de solução DNPH (10 mmol L⁻¹) diluído em ácido clorídrico (7 %). A solução foi
205 homogeneizada em vortex e mantida em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 min.
206 A solução foi centrifugada a 9.000 g, por 10 min, a 15 °C, o sobrenadante descartado e
207 acrescentado 0,5 mL de TCA 10 %. A solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante
208 novamente descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etila e etanol
209 (1:1 v/v). A cada lavagem, a solução foi homogeneizada, centrifugada e descartado o
210 sobrenadante. Ao precipitado, foi adicionado 1 mL de lauril sulfato de sódio 6 %. A solução foi
211 homogeneizada e centrifugada a 9.000 g, por 10 min, a 15 °C. O sobrenadante foi utilizado para
212 determinar a concentração de PC em leitor de ELISA à 370 nm. Foi realizado um branco para

213 cada amostra, em que foi adicionado 0,5 mL de solução de ácido clorídrico 7 % ao precipitado
214 em substituição à solução de DNPH. O teor de PC foi expresso em nmol mL⁻¹.

215 Para avaliar a concentração de NO, o nitrito foi usado como indicador da síntese de
216 óxido nítrico. O nitrito é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1 % de sulfanilamida
217 e 0,1 % naftil-etileno-diamina, em 2,5 % H₃PO₄. Desta forma, 50 µL do sobrenadante foram
218 adicionados em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado à temperatura
219 ambiente por 15 min. Em seguida, foi feita a leitura em um leitor de ELISA, a 540 nm (Griess,
220 1879). Os resultados foram expressos em µM.

221 **2.2.4 Qualidade de água**

222 Foram coletadas amostras de água antes e após o transporte para avaliação da
223 temperatura e oxigênio dissolvido, por meio de oxímetro digital (YSI[®]– 550A), pH, por meio
224 de medidor de pH digital (YUMP[®] – ph-618) e amônia total por kit colorimétrico (LabconTest[®]
225 – Amônia Tóxica). A amônia não ionizada foi calculada com base na fórmula:

$$226 \quad \text{Amônia não ionizada} = \frac{\text{amônia total}}{\left[1 + 10 \left\{ (0,0902 - \text{pH}) + \left(\frac{2730}{273,3 + \text{temperatura}} \right) \right\} \right]}$$

227 **2.2.5 Análise estatística**

228 Para avaliar o efeito do transporte, foram comparadas as variáveis analisadas antes do
229 transporte e após o transporte dos peixes embalados individualmente, sem óleo de cravo, por
230 meio de análise de variância.

231 Para avaliar o efeito do óleo de cravo, foi realizada análise de variância e regressão
232 polinomial, tanto para os peixes embalados individualmente, quanto para os embalados
233 coletivamente.

234 Foi adotado o nível de 5 % de significância, utilizando o *software* R[®] 3.6.1 (pacote
235 *ExpDes.pt*). Para escolha do modelo de regressão, foi considerada a significância dos
236 coeficientes da regressão, a magnitude dos coeficientes de determinação e o comportamento
237 das variáveis em estudo.

238 **3. RESULTADOS**239 **3.1 Efeito do transporte em machos adultos de *Betta splendens* embalados**
240 **individualmente, sem óleo de cravo**241 Após o transporte, houve aumento ($p < 0,05$) dos teores de glicose e lactato sanguíneos.
242 Porém, para o cortisol, não houve efeito significativo (Tabela 3).243 Para as variáveis de estado oxidativo, houve aumento ($p < 0,05$) de NO, de MDA e da
244 atividade da SOD. Para PC e CAT não houve efeito significativo do transporte (Tabela 4).245 Para as variáveis de qualidade de água, foi observada redução ($p < 0,05$) do teor de oxigênio
246 dissolvido e do pH, e aumento ($p < 0,05$) da amônia não ionizada e da temperatura da água (Tabela
247 5).248 **Tabela 3.** Valores médios das variáveis de respostas de estresse, antes e após o transporte, de
249 machos adultos de de *Betta splendens* embalados individualmente, sem óleo de cravo

	Antes do transporte	Após o transporte	p-valor	CV (%)
Cortisol ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,3216	0,2141	$3,66 \times 10^{-01}$	55,87
Glicose (mg dL^{-1})	22,00	32,09	$3,06 \times 10^{-03}$	11,50
Lactato (mg dL^{-1})	1,70	2,95	$4,33 \times 10^{-02}$	19,53

250 CV = Coeficiente de variação. Valores em negrito são significativos ao nível de 5 % de
251 probabilidade.252 **Tabela 4.** Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias, antes e após o
253 transporte, de machos adultos de de *Betta splendens* embalados individualmente, sem óleo de
254 cravo

	Antes do transporte	Após o transporte	p-valor	CV (%)
NO (μM)	10,77	84,58	$2,73 \times 10^{-02}$	36,43
MDA ($\mu\text{M MDA mg}^{-1}$ de tecido)	0,1158	0,1470	$4,11 \times 10^{-02}$	7,37
PC (nmol mL^{-1})	4,81	4,88	$7,78 \times 10^{-01}$	5,10
SOD (U SOD mg^{-1} de tecido)	0,7816	0,9123	$6,20 \times 10^{-03}$	2,41
CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de tecido)	0,1231	0,2347	$4,50 \times 10^{-01}$	74,30

255 CV = Coeficiente de variação. NO= óxido nítrico; MDA= malondialdeído; PC= proteína
256 carbonilada; SOD= superóxido dismutase; CAT= catalase. Valores em negrito são
257 significativos ao nível de 5 % de probabilidade.258 **Tabela 5.** Valores médios das variáveis de qualidade de água, antes e após o transporte, de
259 machos adultos de de *Betta splendens* embalados individualmente, sem óleo de cravo

	Antes do transporte	Após o transporte	p-valor	CV (%)
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	6,77	3,11	$4,78 \times 10^{-05}$	4,84
pH	6,24	6,02	$3,04 \times 10^{-06}$	0,21
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24,60	26,65	$4,95 \times 10^{-04}$	0,88
Amônia não ionizada (mg L^{-1})	0,0000	0,0163	$1,22 \times 10^{-03}$	49,34

260 CV = Coeficiente de variação. Valores em negrito são significativos ao nível de 5 % de
261 probabilidade.

262 **3.2 Efeito do óleo de cravo em machos adultos de *Betta splendens*, embalados**
 263 **individualmente, durante o transporte**

264 Não houve efeito significativo do óleo de cravo na taxa de sobrevivência e nos danos
 265 corporais dos peixes (Tabela 6). Para as respostas de estresse, o óleo de cravo mostrou efeito
 266 quadrático ($p < 0,05$) no teor de cortisol (Tabela 7 e Figura 3), porém, não influenciou
 267 significativamente os teores de glicose e lactato sanguíneos (Tabela 7).

268 Para as variáveis de estado oxidativo, o óleo de cravo apresentou efeito ($p < 0,05$) linear
 269 crescente para NO (Tabela 8 e Figura 4), efeito cúbico para PC (Tabela 8 e Figura 5), e efeito
 270 quadrático para MDA (Tabela 8 e Figura 6) e SOD (Tabela 8 e Figura 7). Entretanto, o óleo de
 271 cravo não influenciou a atividade da CAT (Tabela 8).

272 Para o pH da água, houve efeito quadrático ($p < 0,05$) do óleo de cravo (Tabela 9 e Figura 8).
 273 Entretanto, o óleo de cravo não influenciou significativamente os teores de oxigênio dissolvido e
 274 amônia não ionizada (Tabela 9).

275 **Tabela 6.** Valores médios dos danos corporais e da taxa de sobrevivência de machos adultos
 276 de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o
 277 transporte

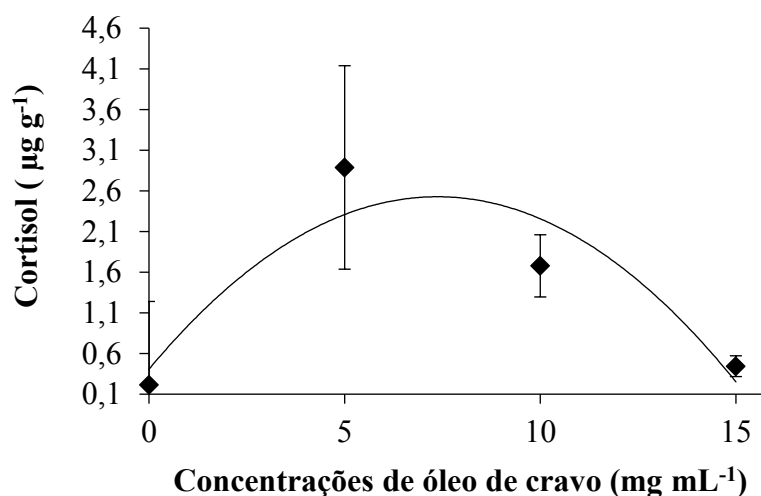
	I ₀	I ₅	I ₁₀	I ₁₅	p-valor	CV (%)
Danos corporais	1,11	1,11	1,03	1,00	$2,06 \times 10^{-01}$	7,93
Taxa de sobrevivência (%)	100	98,44	100	98,44	$5,88 \times 10^{-01}$	2,23

278 CV = Coeficiente de variação. I₀ = peixes embalados individualmente, sem sedativo; I₅ =
 279 peixes embalados individualmente com 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₀ = peixes embalados
 280 individualmente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₅ = peixes embalados individualmente com
 281 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo.

282 **Tabela 7.** Valores médios das respostas de estresse de machos adultos de *Betta splendens*,
 283 embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

	I ₀	I ₅	I ₁₀	I ₁₅	p-valor	CV (%)
¹ Cortisol ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,2141	2,8877	1,6773	0,4441	$3,25 \times 10^{-04}$	44,48
Glicose (mg dL^{-1})	32,21	41,96	38,08	39,22	$9,89 \times 10^{-02}$	15,23
Lactato (mg dL^{-1})	2,95	2,35	2,18	1,98	$8,17 \times 10^{-02}$	16,60

284 CV = Coeficiente de variação. I₀ = peixes embalados individualmente, sem sedativo; I₅ = peixes
 285 embalados individualmente com 5 mg L^{-1} de óleo de cravo; I₁₀ = peixes embalados
 286 individualmente com 10 mg L^{-1} de óleo de cravo; I₁₅ = peixes embalados individualmente com
 287 15 mg L^{-1} de óleo de cravo. Valor em negrito é significativo ao nível de 5 % de probabilidade.
 288 ¹ $y = 0,4673 + 0,5623x - 0,0384x^2$ ($R^2 = 0,83$)



289 **Figura 3.** Efeito do óleo de cravo sobre o teor de cortisol (valores médios \pm desvio padrão, $y =$
 290 $0,4673 + 0,5623x - 0,0384x^2$, $R^2 = 0,83$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 291 individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

292 **Tabela 8.** Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias de machos adultos de
 293 *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

	I ₀	I ₅	I ₁₀	I ₁₅	p-valor	CV (%)
¹ NO (µM)	85,58	95,61	82,32	190,30	6,76x10⁻⁰³	17,76
² MDA (µM MDA mg ⁻¹ de tecido)	0,1470	0,1238	0,1527	0,1890	1,39x10⁻⁰⁴	2,90
³ PC (nmol mL ⁻¹)	4,88	10,07	8,93	10,45	4,54x10⁻⁰⁵	4,64
⁴ SOD (U SOD mg ⁻¹ de tecido)	0,9123	0,7681	0,8833	1,105	8,19x10⁻⁰⁴	6,45
CAT (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	0,2347	0,4768	0,3095	0,5320	3,84x10 ⁻⁰¹	56,28

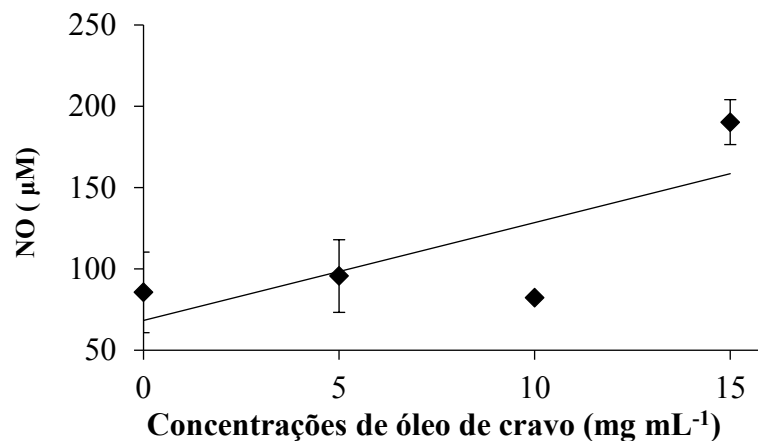
294 CV = Coeficiente de variação. I₀ = peixes embalados individualmente, sem sedativo; I₅ = peixes
 295 embalados individualmente com 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₀ = peixes embalados
 296 individualmente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₅ = peixes embalados individualmente com
 297 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. NO= óxido nítrico; MDA= malondialdeído; PC= proteína
 298 carbonilada; SOD= superóxido dismutase; CAT= catalase. Valores em negrito são
 299 significativos ao nível de 5 % de probabilidade.

300 $^1y = 72,798 + 5,633x$ ($R^2 = 0,51$)

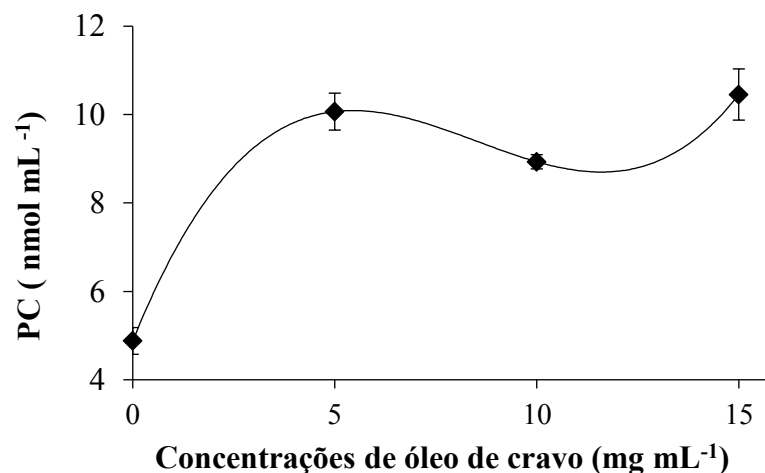
301 $^2y = 0,146 - 0,0060x + 0,0006x^2$ ($R^2 = 0,93$)

302 $^3y = 4,8788 + 2,2694x - 0,3062x^2 + 0,01198x^3$ ($R^2 = 99$)

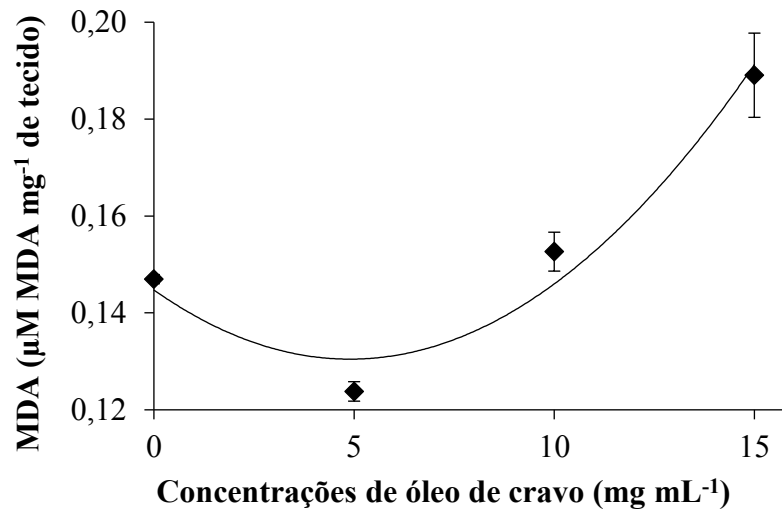
303 $^4y = 0,90469 - 0,04103x + 0,003066x^2$ ($R^2 = 0,85$)



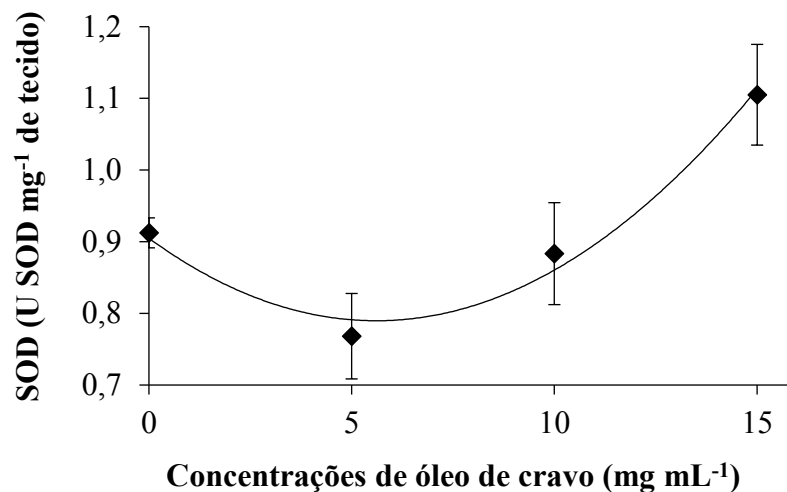
304 **Figura 4.** Efeito do óleo de cravo sobre o NO – Óxido nítrico (valores médios ± desvio padrão,
 305 $y = 72,798 + 5,633x$, $R^2 = 0,51$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 306 individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



307 **Figura 5.** Efeito do óleo de cravo sobre a PC – proteína carbonilada (valores médios ± desvio
 308 padrão, $y = 4,8788 + 2,2694x - 0,3062x^2 + 0,01198x^3$, $R^2 = 0,99$) de machos adultos de *Betta*
 309 *splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



310 **Figura 6.** Efeito do óleo de cravo sobre o MDA – malondialdeído (valores médios ± desvio
 311 padrão, $y = 0,146 - 0,0060x + 0,0006x^2$, $R^2 = 0,93$) de machos adultos de *Betta splendens*,
 312 embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

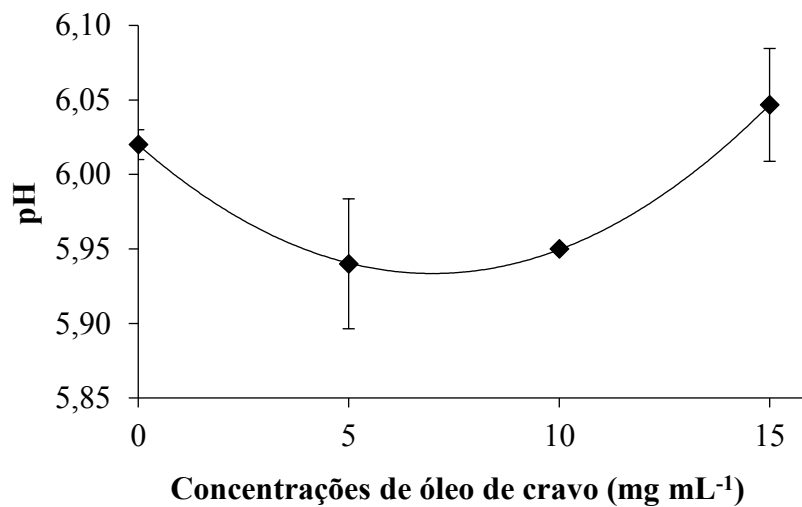


313 **Figura 7.** Efeito do óleo de cravo sobre a atividade da SOD – superóxido dismutase (valores
 314 médios ± desvio padrão, $y = 0,90469 - 0,04103x + 0,003066x^2$, $R^2 = 0,85$) de machos adultos
 315 de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o
 316 transporte.

317 **Tabela 9.** Valores médios das variáveis de qualidade de água de transporte de machos adultos
 318 de *Betta splendens*, embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o
 319 transporte

	I ₀	I ₅	I ₁₀	I ₁₅	p-valor	CV (%)
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	3,11	3,06	2,97	3,08	1,64x10 ⁻⁰¹	2,28
¹ pH	6,02	5,94	5,95	6,05	5,05x10⁻⁰³	0,49
Amônia não ionizada (mg L ⁻¹)	0,0162	0,0162	0,0161	0,0137	8,89x10 ⁻⁰¹	35,11

320 CV = Coeficiente de variação. I₀ = peixes embalados individualmente, sem sedativo; I₅ = peixes
 321 embalados individualmente com 5 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₀ = peixes embalados
 322 individualmente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo; I₁₅ = peixes embalados individualmente com
 323 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Valor em negrito é significativo ao nível de 5 % de probabilidade.
 324 ¹y = 6,01983 – 0,0247x + 0,001767x² (R² = 0,78)



325 **Figura 8.** Efeito do óleo de cravo sobre o pH (valores médios ± desvio padrão, $y = 6,01983 -$
 326 $0,0247x + 0,001767x^2$, $R^2 = 0,78$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*,
 327 embalados individualmente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

328 **3.3 Efeito do óleo de cravo em machos adultos de *Betta splendens*, embalados**
 329 **coletivamente, durante o transporte**

330 O óleo de cravo apresentou efeito quadrático ($p < 0,05$) sobre a taxa de sobrevivência
 331 (Tabela 10 e Figura 9) e efeito linear decrescente ($p < 0,05$) sobre os danos corporais (Tabela 10
 332 e Figura 10). O óleo de cravo mostrou efeito linear crescente ($p < 0,05$) para glicose (Tabela 11
 333 e Figura 11), porém, não influenciou os teores de cortisol e de lactato (Tabela 11).

334 Para as variáveis de estado oxidativo, houve efeito quadrático ($p < 0,05$) para o MDA
 335 (Tabela 12 e Figura 12) e PC (Figura 13). Entretanto, para NO, SOD e CAT, não houve efeito
 336 do óleo de cravo (Tabela 12).

337 Para as variáveis de qualidade de água, o óleo de cravo proporcionou efeito quadrático
 338 ($p < 0,05$) no teor de oxigênio dissolvido (Tabela 13 e Figura 14) e no pH (Tabela 13 e Figura
 339 15), e efeito linear decrescente ($p < 0,05$) na amônia não ionizada (Tabela 13 e Figura 16).

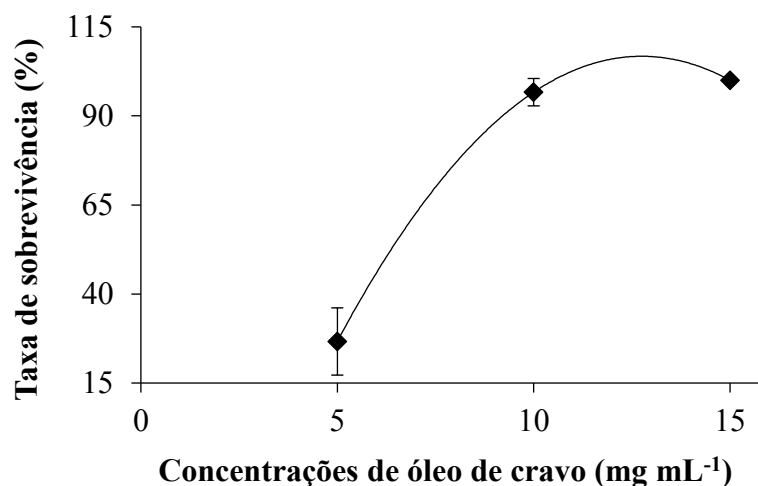
340 **Tabela 10.** Valores médios dos danos corporais e da taxa de sobrevivência de machos adultos
 341 de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

	C ₅	C ₁₀	C ₁₅	p-valor	CV (%)
¹ Danos corporais	2,96	2,78	1,21	$4,29 \times 10^{-03}$	25,46
² Taxa de sobrevivência	26,66	96,67	100	$3,6 \times 10^{-08}$	7,90

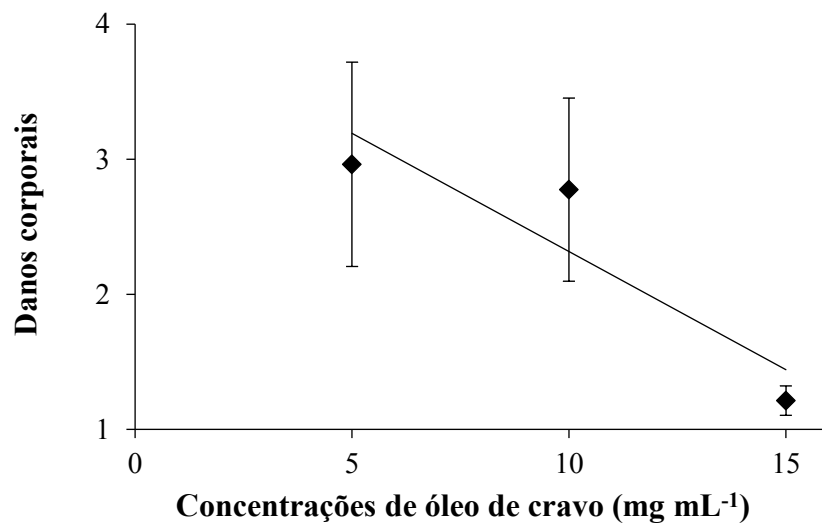
342 CV = Coeficiente de variação. C₅ = peixes embalados coletivamente com 5 mg L⁻¹ de óleo de
 343 cravo; C₁₀ = peixes embalados coletivamente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo e C₁₅ = peixes
 344 embalados coletivamente com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Valores em negrito são significativos
 345 ao nível de 5 % de probabilidade.

346 $^1y = 4,06645 - 0,17497x$ ($R^2 = 0,58$)

347 $^2y = -110 + 33,99x - 1,33x^2$ ($R^2 = 0,98$)



348 **Figura 9.** Efeito do óleo de cravo sobre a taxa de sobrevivência (valores médios \pm desvio
 349 padrão, $y = -110 + 33,99x - 1,33x^2$, $R^2 = 0,98$) de machos adultos de *Betta splendens*,
 350 embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



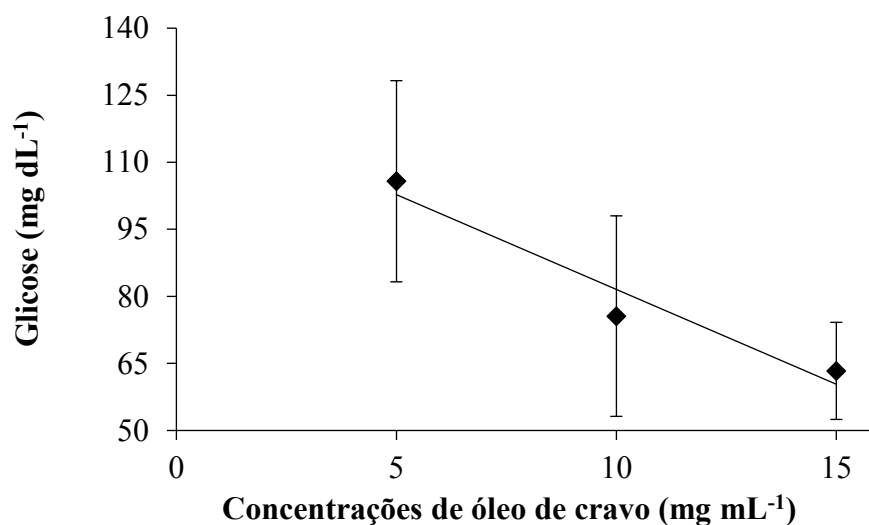
351 **Figura 10.** Efeito do óleo de cravo sobre os danos corporais (valores médios \pm desvio padrão,
 352 $y = 4,06645 - 0,17497x$, $R^2 = 0,58$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 353 coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

354 **Tabela 11.** Valores médios das respostas de estresse de machos adultos de *Betta splendens*,
 355 embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

	C ₅	C ₁₀	C ₁₅	p-valor	CV (%)
Cortisol ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,9137	0,7369	0,5072	$4,65 \times 10^{-01}$	62,06
¹ Glicose (mg dL^{-1})	105,75	75,58	63,33	$3,35 \times 10^{-02}$	23,77
Lactato (mg dL^{-1})	2,63	3,27	3,45	$7,42 \times 10^{-01}$	37,82

356 CV = Coeficiente de variação. C₅ = peixes embalados coletivamente com 5 mg L⁻¹ de óleo de
 357 cravo; C₁₀ = peixes embalados coletivamente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo e C₁₅ = peixes
 358 embalados coletivamente com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Valor em negrito é significativo ao
 359 nível de 5 % de probabilidade.

360 $^1y = 123,97 - 4,2415x$ ($R^2 = 0,94$)



361 **Figura 11.** Efeito do óleo de cravo no teor de glicose sanguínea (valores médios \pm desvio
 362 padrão, $y = 123,97 - 4,2415x$, $R^2 = 0,94$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 363 coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

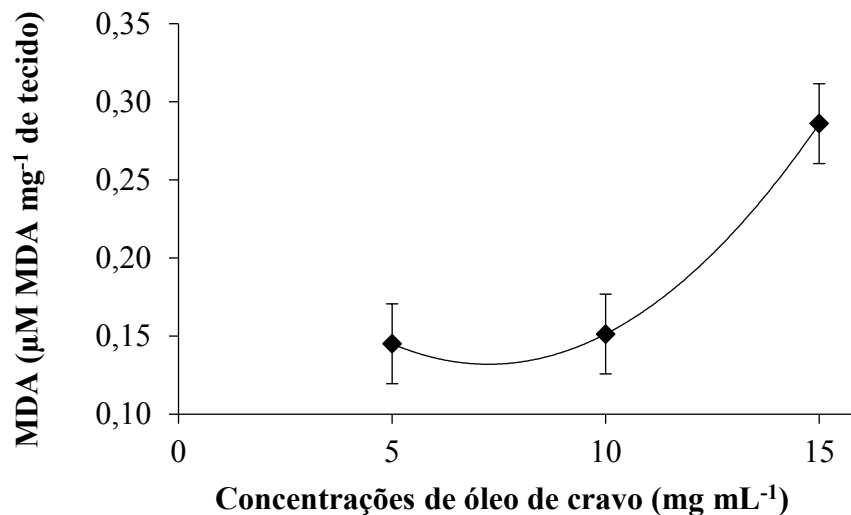
364 **Tabela 12.** Valores médios das variáveis de estado oxidativo de brânquias de machos adultos
 365 de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

	C ₅	C ₁₀	C ₁₅	p-valor	CV (%)
NO (μM)	149,10	87,70	103,61	1,06x10 ⁻⁰¹	23,25
¹ MDA (μM MDA mg ⁻¹ de tecido)	0,1451	0,1380	0,2581	3,55x10⁻⁰⁶	11,28
² PC (nmol mL ⁻¹)	7,96	9,82	9,80	5,00x10⁻⁰²	5,36
SOD (U SOD mg ⁻¹ de tecido)	0,8979	0,7790	0,8638	1,91x10 ⁻⁰¹	7,68
CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ de tecido)	0,5391	0,6388	0,4399	7,63x10 ⁻⁰²	15,06

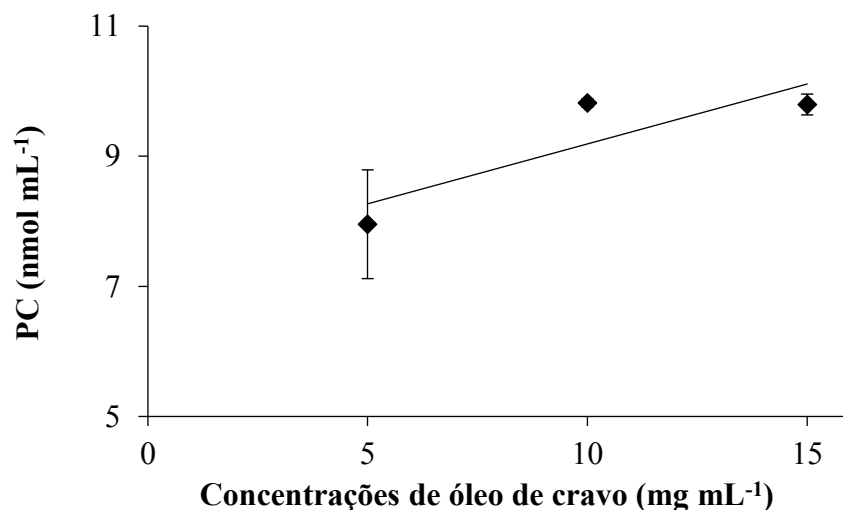
366 CV = Coeficiente de variação. C₅ = peixes embalados coletivamente com 5 mg L⁻¹ de óleo de
 367 cravo; C₁₀ = peixes embalados coletivamente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo e C₁₅ = peixes
 368 embalados coletivamente com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. NO= óxido nítrico; MDA=
 369 malondialdeído; PC= proteína carbonilada; SOD= superóxido dismutase; CAT= catalase.
 370 Valores em negrito são significativos ao nível de 5 % de probabilidade.

371 ¹y = 2,04 - 0,7x + 0,0642x² (R² = 1)

372 ²y = 7,3485 + 0,1841x (R² = 0,74)



373 **Figura 12.** Efeito do óleo de cravo sobre MDA- malondialdeído (valores médios ± desvio
 374 padrão, $y = 2,04 - 0,7x + 0,0642x^2$, $R^2 = 1$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 375 coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



376 **Figura 13.** Efeito do óleo de cravo sobre PC- proteína carbonilada (valores médios ± desvio
 377 padrão, $y = 7,3485 + 0,1841x$, $R^2 = 0,74$) de machos adultos de *Betta splendens*, embalados
 378 coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

379 **Tabela 13.** Valores médios das variáveis de qualidade de água de transporte de machos adultos
 380 de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte

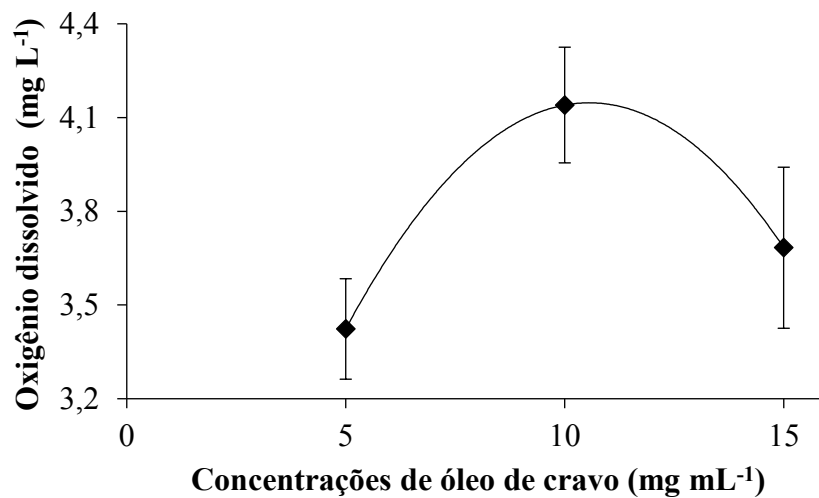
	C5	C10	C15	p-valor	CV (%)
¹ Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	3,42	4,14	3,68	1,43 x 10⁻⁰²	5,48
² pH	6,74	6,21	6,17	3,13 x 10⁻⁰⁶	0,83
³ Amônia não ionizada (mg L ⁻¹)	0,0215	0,0179	0,0112	2,96 x 10⁻⁰³	17,12

381 CV = Coeficiente de variação. C₅ = peixes embalados coletivamente com 5 mg L⁻¹ de óleo de
 382 cravo; C₁₀ = peixes embalados coletivamente com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo e C₁₅ = peixes
 383 embalados coletivamente com 15 mg L⁻¹ de óleo de cravo. Valores em negrito são significativos
 384 ao nível de 5 % de probabilidade.

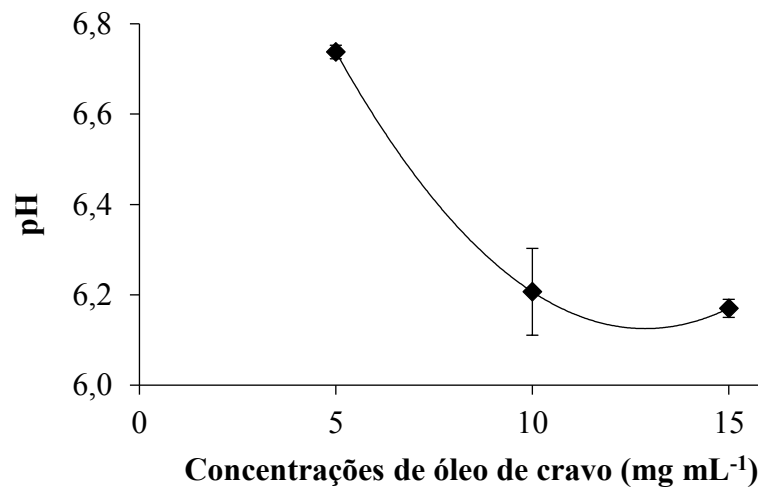
385 $^1y = 1,533 + 0,4953x - 0,02347x^2$ ($R^2 = 0,76$)

386 $^2y = 7,7625 - 0,2544x + 0,0099x^2$ ($R^2 = 0,97$)

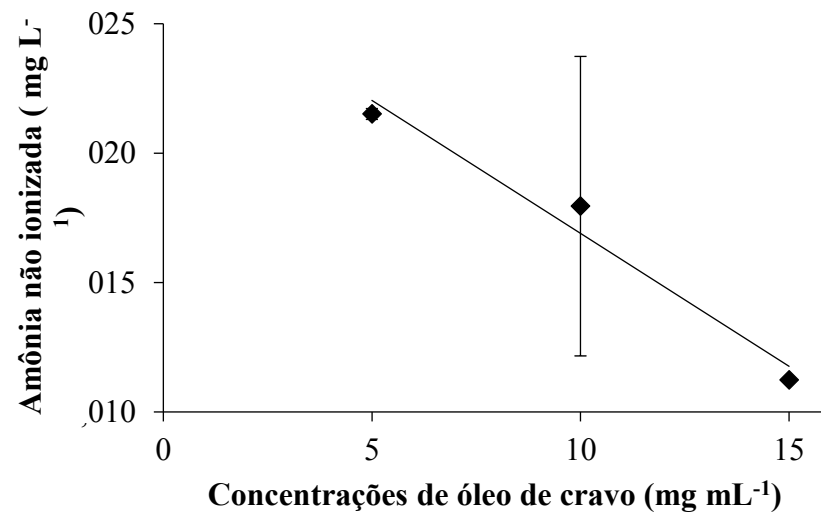
387 $^3y = 0,0271 - 0,00103x$ ($R^2 = 0,75$)



388 **Figura 14.** Efeito do óleo de cravo sobre o teor de oxigênio dissolvido (valores médios \pm desvio
 389 padrão, $y = 1,533 + 0,4953x - 0,02347x^2$, $R^2 = 0,76$) da água de transporte de machos adultos
 390 de *Betta splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



391 **Figura 15.** Efeito do óleo de cravo sobre o pH (valores médios \pm desvio padrão, $y = 7,7625 -$
 392 $0,2544x + 0,0099x^2$, $R^2 = 0,97$) da água de transporte de machos adultos de *Betta splendens*,
 393 embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.



394 **Figura 16.** Efeito do óleo de cravo sobre a amônia não ionizada (valores médios \pm desvio
395 padrão, $y = 0,0271 - 0,00103x$, $R^2 = 0,75$) da água de transporte de machos adultos de *Betta*
396 *splendens*, embalados coletivamente e sedados com óleo de cravo durante o transporte.

4. DISCUSSÃO

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

O aumento do teor de lactato sanguíneo após o transporte possivelmente ocorreu em função da maior atividade muscular para a manutenção do equilíbrio dos peixes, uma vez a produção de lactato muscular pode ocorrer mesmo em baixas velocidades de natação (Di Santo, Kenaley & Lauder, 2017). A difusão do lactato para o sangue permite que este seja metabolizado no fígado como substrato para gliconeogênese (Milligan & Girard, 1993; Nelson & Cox, 2013; Vijayan et al., 1997), podendo, assim, explicar o aumento da glicemia. Apesar do lactato ser considerado um indicador de estresse em peixes, Vijayan et al. (1997) observaram que a injeção intraperitoneal de cortisol em tilápia não resultou em aumento do lactato, o que indica que o aumento da glicemia e do lactato provavelmente não está relacionado com respostas de estresse. A ausência de efeito do transporte sobre o teor de cortisol, o principal indicador de estresse em peixes (Sampaio & Freire, 2016), reforça a hipótese de que o aumento da glicose e lactato sanguíneos não representa respostas de estresse. Esses resultados indicam que o betta é tolerante a fatores estresses relacionados com captura, contenção e transporte.

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

A análise do estado oxidativo das brânquias dos peixes mostrou que o transporte causou aumento das espécies reativas (NO) e dos danos lipídicos (MDA) em betta, como observado por Evereklioglu et al. (2003). Essas alterações devem estar relacionadas ao aumento da demanda por oxigênio para manutenção postural, que leva ao aumento da atividade mitocondrial (Ferreira, Barros & Abreu, 2009), e consequente formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e peroxidação lipídica (Fridovich, 1999; Valko et al., 2007). O NO promove aumento da atividade da SOD, que causa diminuição do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e aumento da formação de H_2O_2 (Wolin, 2000). Com a redução da concentração de $O_2^{\bullet-}$, menos peroxinitrito ($ONOO^-$) é formado, o que reduz a probabilidade de danos nitrosativos (Wolin, 2000). O H_2O_2 formado pela ação da SOD precisa ser neutralizado pela enzima CAT, mas como não houve aumento da atividade dessa enzima, isso pode explicar o aumento do MDA nas brânquias de bettas submetidos ao transporte.

423

424

425

426

427

428

429

430

As mudanças na qualidade de água, ocorridas durante o transporte de betta, foram semelhantes às observadas no transporte de outras espécies de peixes (Becker et al., 2013; Ferreira, Schoonbee & Smit, 1984; Pramod, Sajeevan, Ramachandran, Thampy & Pai, 2010; Sena et al., 2016). O aumento do teor de amônia deve estar relacionado à mobilização de aminoácidos no tecido muscular, sua desaminação e fornecimento de substrato para gliconeogênese no fígado (Nelson & Cox, 2013), o que acarreta aumento da glicemia. A amônia difunde-se para a água através das brânquias e reage com o H^+ com formação de NH_4^+ , em uma reação reversível. A elevação da amônia, em transporte de longa duração (maior que 8h),

431 frequentemente causa aumento do pH da água (Sampaio & Freire, 2016). Porém, no presente
432 estudo, observamos redução do pH, que pode ter ocorrido em função do aumento da produção
433 de CO₂ e lactato pelos peixes.

434 A menor concentração de óleo de cravo não promoveu efetiva sedação para redução da
435 agressividade de bettas, o que resultou em altos danos corporais e baixa taxa de sobrevivência..
436 A alta taxa de sobrevivência observada nos bettas sedados com 10 mg L⁻¹ de óleo de cravo
437 indica a possibilidade de transporte coletivo. No entanto, os danos corporais observados
438 (próximo de 3) inviabilizam a comercialização dos peixes e, conseqüentemente, essa
439 concentração de sedativo mostrou-se ineficaz para o transporte de bettas embalados de forma
440 coletiva. A alta taxa de sobrevivência e os baixos danos corporais observados nos peixes
441 transportados na maior concentração de óleo de cravo avaliada (15 mg L⁻¹), indicam que é
442 possível transportar machos adultos de betta embalados coletivamente. A redução da
443 agressividade deve ter ocorrido devido ao efeito do eugenol no sistema nervoso central e
444 periférico. O efeito sedativo do eugenol no sistema nervoso central provavelmente é mediado
445 por ação agonista nos receptores GABA (Yang et al., 2003). Apesar do mecanismo de ação
446 anestésico/sedativo não estar completamente elucidado, Sahin et al. (2017) observaram que o
447 extrato aquoso de cravo atua como analgésico por meio da modulação da atividade dos
448 receptores GABA, potencializando a hiperpolarização da membrana por mecanismo alostérico,
449 concentração dependente. Portanto, a ação sedativa do eugenol pode se dar por mecanismo
450 semelhante ao que promove redução da sensação de dor. A ação periférica do eugenol se dá por
451 meio do bloqueio dos receptores nicotínicos para acetilcolina na placa motora, com mecanismo
452 semelhante ao do curare (Brodin & Roed, 1984), o que inibe a contração muscular. O efeito
453 miorrelaxante do eugenol foi comprovado por Fujimoto et al. (2018) em três espécies de peixes
454 ornamentais: *Paracheirodon axelrodi*, *Heros severus* e *Pterophyllum scalare*.

455 Para os peixes embalados individualmente, como era esperado, foram observadas altas
456 taxas de sobrevivência e baixos danos corporais, uma vez que não houve contato entre os peixes
457 durante o transporte.

458 O efeito do óleo de cravo sobre as respostas de estresse de betta mostrou comportamento
459 bimodal, uma vez que os peixes acondicionados individualmente apresentaram aumento do teor
460 de cortisol na concentração de 5 mg L⁻¹ e redução na concentração de 15 mg L⁻¹. Efeito
461 semelhante foi observado para glicose sanguínea dos peixes embalados coletivamente. A
462 ausência de efeito significativo do óleo de cravo sobre o teor de cortisol nos peixes embalados
463 coletivamente pode ser atribuída à grande variação individual observada. O comportamento
464 bimodal do óleo de cravo provavelmente ocorreu em função de sua ação irritante mediada pela

465 estimulação de receptores TRPV1 (Yang et al., 2003), e/ou inibição de canais de potássio
466 voltagem dependentes de neurônios nociceptores (Li et al., 2007) e consequente sensação de
467 dor. É possível que a dose mais baixa de óleo de cravo tenha estimulado os receptores de dor
468 nos peixes, sem promover sedação, o que resultou em aumento das respostas de estresse,
469 enquanto a dose mais alta, apesar de ter causado irritação, foi suficiente para sedar os peixes e
470 promover diminuição das respostas de estresse. Assim, apesar do betta ter se mostrado menos
471 sensível ao estresse desencadeado pelo transporte, o mesmo é sensível ao óleo de cravo como
472 substância irritante.

473 O aumento dos danos oxidativos nas brânquias (MDA e PC), tanto nos peixes embalados
474 individualmente, como coletivamente, provavelmente ocorreu devido ao efeito irritante do óleo
475 de cravo (Yang et al., 2003; Li et al., 2007), como ocorre com pesticidas, metais pesados e
476 derivados de petróleo (Martínez-Álvarez, Morales & Sanz, 2005; Winston & Giulio, 1991).
477 Apesar de não termos encontrados relatos do eugenol como causador de irritação nas brânquias
478 de peixes, Readman, Owen, Murrell, & Knowles (2013) observaram respostas aversivas em
479 *Danio rerio* ao isoeugenol. A maior concentração de MDA e PC nas brânquias dos peixes
480 submetidos às maiores concentrações de óleo de cravo podem ser atribuídas ao maior teor de
481 óxido nítrico observado, uma vez que o NO é um importante causador de peroxidação lipídica
482 (Evereklioglu et al., 2003) e carbonilação de proteínas (Dalle-Donne, Rossi, Giustarini, Milzani
483 & Colombo, 2003). Esses resultados indicam que a ação antioxidante do cravo (Gülçin et al.,
484 2012; Cortés-Rojas et al., 2014) não foi capaz de neutralizar os danos oxidativos observados,
485 mesmo tendo promovido o aumento da atividade da SOD nos peixes embalados
486 individualmente. Portanto, há a necessidade de avaliação da capacidade do betta de recuperação
487 dos danos oxidativos causados pelo óleo de cravo, bem como avaliação de outros sedativos com
488 maior capacidade antioxidante em peixes submetidos ao transporte.

489 Em transportes de longa duração (maior que 8 h), o principal problema é a elevação da
490 amônia na água (Sampaio & Freire, 2016). Dessa forma, a prevenção desse efeito deve ser uma
491 das principais preocupações. Nos peixes embalados coletivamente, o óleo de cravo promoveu
492 a diminuição da excreção de amônia, provavelmente pelo efeito sedativo, com redução do
493 metabolismo (Cupp, Hartleb, Fredricks, & Gaikowski, 2016) e, conseqüentemente, da
494 necessidade de síntese de ATP. Com a redução das reservas de glicogênio, a manutenção da
495 glicemia depende da mobilização de proteínas teciduais e desaminação de aminoácidos como
496 substrato para gliconeogênese (Nelson & Cox, 2013). Portanto, a taxa metabólica e a
497 desaminação de aminoácidos devem ter sido menores, com menor excreção de amônia, o que

498 indica que o óleo de cravo é um sedativo benéfico para a manutenção da qualidade da água em
499 transportes de longa duração.

500 A redução do pH da água dos peixes embalados coletivamente, pode ter sido causada
501 pela excreção de H^+ , devido à necessidade de manutenção do pH sanguíneo em resposta à
502 elevação do lactato formado nos músculos. Mesmo não tendo sido observado efeito
503 significativo do óleo de cravo sobre o teor de lactato sanguíneo, houve tendência de aumento
504 nas maiores concentrações de óleo de cravo. O estágio de sedação alcançado pelos bettas com
505 o uso de 15 mg L^{-1} de óleo de cravo resulta em redução da ventilação branquial (Patanasiri et
506 al., 2017), o que poderia aumentar a produção de lactato devido à redução da captação de
507 oxigênio da água, e conseqüente metabolismo anaeróbico.

508 Apesar da eficácia do óleo de cravo em produzir sedação suficiente para redução da
509 agressividade de machos de betta, e possibilitar seu transporte coletivo, são necessários novos
510 estudos para avaliar concentrações mais altas, uma vez que os melhores resultados obtidos
511 foram com a maior concentração avaliada. Além disso, é necessária a avaliação da capacidade
512 de recuperação dos danos oxidativos de bettas transportados sob sedação com óleo de cravo,
513 bem como a avaliação de outros sedativos que não provoquem irritação e estresse oxidativo nas
514 brânquias.

5. REFERÊNCIAS

- 515
516 Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
517 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- 518 Anderson, W. G., McKinley, R. S. & Colavecchia, M. (1997). The use of clove oil as an
519 anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal*
520 *of Fisheries Management*, 17, 301-307. [https://doi.org/10.1577/1548-](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1997)017<0301:TUOAOA>2.3.CO;2)
521 [8675\(1997\)017<0301:TUOAOA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1997)017<0301:TUOAOA>2.3.CO;2)
- 522 Barton, B. A. (2000). Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling
523 and transport stress. *North American Journal of Aquaculture*, 62, 12-18.
524 [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2)
- 525 Becker, A. G., Cunha, M. A. D., Garcia, L. D. O., Zeppenfeld, C. C., Parodi, T. V., Maldaner,
526 G., ... & Baldisserotto, B. (2013). Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia*
527 *buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology*,
528 11, 675-681. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252013000300021>
- 529 Braun, N. & Nuñez, A. P. D. O. (2014). Stress in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes:
530 Pimelodidae) at different densities and times in a simulated transport. *Zoologia (Curitiba)*, 31,
531 101–104. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702014000100012>
- 532 Brodin, P., & Røed, A. (1984). Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-
533 diaphragm preparations. *Archives of Oral Biology*, 29(8), 611-615
534 [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(84\)90130-4](https://doi.org/10.1016/0003-9969(84)90130-4)
- 535 Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*,
536 52, 302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- 537 Cardoso, R. S; Lana, Â. M. Q; Teixeira, E. A; Luz, R. K; Faria, P. M.C. (2012). Caracterização
538 socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira *Bol. Inst. Pesca*,
539 São Paulo, 38, 89 – 96.
- 540 Chapman, F. A., Fitz-Coy, S. A., Thunberg, E. M., & Adams, C. M. (1997). United States of
541 America trade in ornamental fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28, 1-10.
542 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1997.tb00955.x>

- 543 Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F. & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*):
544 a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, 90-96.
545 [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)
- 546 Cupp, A. R., Hartleb, C. F., Fredricks, K. T., & Gaikowski, M. P. (2016). Effectiveness of
547 eugenol sedation to reduce the metabolic rates of cool and warm water fish at high loading
548 densities. *Aquaculture research*, 47, 234-242. <https://doi.org/10.1111/are.12485>
- 549 Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl
550 groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329, 23-38.
551 [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- 552 Detar, J. E. & Mattingly, H. T. (2004). Response of southern redbelly dace to clove oil and MS-
553 222: Effects of anesthetic concentration and water temperature. *Proc Ann Con Southeastern*
554 *Assoc Fish Wildl Agen*, 58, 219-227. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140024>
- 555 Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G. & Prestle, J. (2000). Gene Expression of
556 Antioxidative Enzymes in the Human Heart. *Circulation*, 101, 33-39.
557 <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- 558 Di Santo, V., Kenaley, C. P. & Lauder, G. V. (2017). High postural costs and anaerobic
559 metabolism during swimming support the hypothesis of a U-shaped metabolism–speed curve
560 in fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 13048-13053.
561 <https://doi.org/10.1073/pnas.1715141114>
- 562 Evereklioglu, C., Er, H., Doganay, S., Cekmen, M., Turkoz, Y., Otlu, B. & Ozerol, E. (2003).
563 Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant
564 enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Documenta*
565 *ophthalmologica*, 106, 129-136. <https://doi.org/10.1023/A:1022512402811>
- 566 Ferreira, I. C., Barros, L. & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current*
567 *Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>
- 568 Ferreira, J. T., Schoonbee, H. J. & Smit, G. L. (1984). The use of benzocaine-hydrochloride as
569 an aid in the transport of fish. *Aquaculture*, 42, 169-174. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90364-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90364-8)
570

- 571 Ferreira, P. D. M. F., Rocha, J. S., Gomes, J. R., Caldas, D. W., Martins, M. T. S., de Oliveira,
572 J. M., ... & Zuanon, J. A. S. (2017). Curcuma longa supplementation in the diet of *Astyanax* aff.
573 *bimaculatus* in preparation for transport. *Aquaculture research*, 48, 4524-4532.
574 <https://doi.org/10.1111/are.13277>
- 575 Fischer, I. U., Von Unruh, G. E. & Dengler, H. J. (1990). The metabolism of eugenol in man.
576 *Xenobiotica*, 20, 209-222. <https://doi.org/10.3109/00498259009047156>
- 577 Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with
578 oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 13-18.
579 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x>
- 580 Fujimoto, R. Y., Pereira, D. M., Silva, J. C. S., de Oliveira, L. C. A., Inoue, L. A. K. A., Hamoy,
581 M., ... & Barbas, L. A. L. (2018). Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction
582 power in three Amazon fish species. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 245-256.
583 <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>
- 584 Gregory, M. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings-
585 entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos Trans*
586 *R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2013–2025. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265>
- 587 Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber
588 einige Azoverbindungen“. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12, 426-428.
589 <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>
- 590 Guest, T. W., Blaylock, R. B. & Evans, A. N. (2016). Development of a modified cortisol
591 extraction procedure for intermediately sized fish not amenable to whole-body or plasma
592 extraction methods. *Fish physiology and biochemistry*, 42, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0111-4>
- 594 Gülçin, İ., Elmastaş, M. & Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil—A
595 powerful antioxidant source. *Arabian Journal of chemistry*, 5, 489-499.
596 <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.016>
- 597 Javahery, S., Nekoubin, H. & Moradlu, AH (2012). Efeito da anestesia com óleo de cravo em
598 peixe. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 1545-1552. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>
599

- 600 Karapinar, M. (1990). Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin
601 production of *Aspergillus parasiticus*. International journal of food microbiology, 10, 193-199.
602 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90066-E](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90066-E)
- 603 Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D. & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil
604 as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research,
605 29, 89-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>
- 606 Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P. & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for
607 determination of oxidatively modified proteins. In Methods in enzymology, 233, 346-357.
608 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- 609 Li, H. Y., Park, C. K., Jung, S. J., Choi, S. Y., Lee, S. J., Park, K., ... & Oh, S. B. (2007).
610 Eugenol inhibits K⁺ currents in trigeminal ganglion neurons. Journal of dental research, 86,
611 898-902. <https://doi.org/10.1177/154405910708600918>
- 612 Lim, L. C., Dhert, P. & Sorgeloos, P. (2003). Recent developments and improvements in
613 ornamental fish packaging systems for air transport. Aquaculture Research, 34, 923–935.
614 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00946.x>
- 615 Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E. & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic
616 and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and fisheries, 15, 75-88.
617 <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- 618 Mazzafera, P. (2003). Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol.
619 Revista Brasileira de Botânica, 26, 231-238. [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000200011)
620 [84042003000200011](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000200011)
- 621 Milligan, C. L. & Girard, S. S. (1993). Lactate metabolism in rainbow trout. Journal of
622 Experimental Biology, 180, 175-193.
- 623 Monticini, P. (2010). The ornamental fish trade: production and commerce of ornamental fish:
624 technical-managerial and legislative aspects. Manaus: FAO.
- 625 Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanarothai, N. & Panijpan, B. (2009). The Siamese
626 fighting fish: well-known generally but little-known scientifically. ScienceAsia, 35, 8-16.
627 <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.008>

- 628 Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.)
629 Basingstoke: Macmillan Education.
- 630 Pattanasiri, T., Taparhudee, W. & Suppakul, P. (2017). Acute toxicity and anaesthetic effect of
631 clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquaculture international*,
632 25(1), 163-175. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0020-2>
- 633 Pereira-da-Silva, E. M., Oliveira, R. D., Ribeiro, M. A. R. & Coppola, M. P. (2009). Efeito
634 anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural*, 39, 1851-1856.
635 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000127>
- 636 Pramod, P. K., Sajeevan, T. P., Ramachandran, A., Thampy, S. & Pai, S. S. (2010). Effects of
637 two anesthetics on water quality during simulated transport of a tropical ornamental fish, the
638 Indian tiger barb *Puntius filamentosus*. *North American Journal of Aquaculture*, 72, 290-297.
639 <https://doi.org/10.1577/A09-063.1>
- 640 Pramod, P. K., Ramachandran, A., Sajeevan, T. P., Thampy, S. & Pai, S. S. (2010).
641 Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport
642 conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). *Aquaculture*
643 *Research*, 41, 309-314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02333.x>
- 644 Readman, G. D., Owen, S. F., Murrell, J. C. & Knowles, T. G. (2013). Do fish perceive
645 anaesthetics as aversive?. *PLoS One*, 8, e73773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073773>
- 646 Sahin, S., Eulenburg, V., Heinlein, A., Villmann, C. & Pischetsrieder, M. (2017). Identification
647 of eugenol as the major determinant of GABAA-receptor activation by aqueous *Syzygium*
648 *aromaticum* L. (clove buds) extract. *Journal of functional foods*, 37, 641-649.
649 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.033>
- 650 Sampaio, F. D. & Freire, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport:
651 changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and fisheries*, 17, 1055-1072.
652 <https://doi.org/10.1111/faf.12158>
- 653 Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R. W., & Sloman, K. A. (2010). The effect of
654 group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria.
655 *Applied Animal Behaviour Science*, 125, 195-205.
656 <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.04.008>

- 657 Sena, A. C., Teixeira, R. R., Ferreira, E. L., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Caron, B. O.,
658 ... & Copatti, C. E. (2016). Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective
659 in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma*
660 *macropomum*). *Aquaculture*, 465, 374-379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.033>
- 661 Siddiqui, Y. M., Ettayebi, M., Haddad, A. M. & Al-Ahdal, M. N. (1996). Effect of essential
662 oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex
663 virus type 1 and Newcastle disease virus. *Medical science research*, 24, 185-186.
- 664 Sladky, K. K., Swanson, C. R., Stoskopf, M. K., Loomis, M. R. & Lewbart, G. A. (2001).
665 Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red
666 pacu (*Piaractus brachypomus*). *American journal of veterinary research*, 62, 337-342.
667 <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>
- 668 Stecchini, M. L., Sarais, I. & Giavedoni, P. (1993). Effect of essential oils on *Aeromonas*
669 *hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*, 56, 406-409.
670 <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.5.406>
- 671 Thongprajukaew, K., Pettawee, S., Muangthong, S., Saekhow, S., & Phromkunthong, W.
672 (2019). Freeze-dried forms of mosquito larvae for feeding of Siamese fighting fish (*Betta*
673 *splendens* Regan, 1910). *Aquaculture research*, 50, 296-303. <https://doi.org/10.1111/are.13897>
- 674 Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals
675 and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international*
676 *journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- 677 Vijayan, MM, Pereira, C., Grau, EG, & Iwama, GK (1997). Respostas metabólicas associadas
678 ao estresse de confinamento em tilápias: o papel do cortisol. *Bioquímica Comparada e*
679 *Fisiologia Parte C: Farmacologia, Toxicologia e Endocrinologia*, 116 (1), 89-95.
680 [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00124-7)
- 681 Winston, G. W. & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic
682 organisms. *Aquatic toxicology*, 19, 137-161. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6)
- 683 Wolin, M. S. (2000). Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis,*
684 *thrombosis, and vascular biology*, 20, 1430-1442. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.6.143>

- 685 Woody, C.A., Nelson, J., Ramstad, K. (2002) Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye
686 salmon: field trials. *Journal of Fish Biology* 60, 340–347. <https://doi.org/10.1111/j.1095->
687 8649.2002.tb00284.x
- 688 Yang, B. H., Piao, Z. G., Kim, Y. B., Lee, C. H., Lee, J. K., Park, K., ... & Oh, S. B. (2003).
689 Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of dental research*, 82(10), 781-
690 785. <https://doi.org/10.1177/154405910308201004>
- 691 Zuanon, J. A. S., Morais, J. A. & Souza, A. P. (2016). Dietary crude protein levels for juvenile
692 beta. *Boletim do Instituto de Pesca São Paulo*, 42, 590-597. <https://doi.org/10.20950/1678->
693 2305.2016v42n3p590

ANEXO

Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção
(CEUAP).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone:(31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 12 de Abr. de 2019

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Transporte de machos adultos de *Betta splendens* utilizando óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, como sedativo**", protocolo nº **025/2019**, sob a responsabilidade de **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi apreciado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **28 de Mar. de 2019**.

Finalidade: **Pesquisa** **Ensino**

Vigência do Projeto: de **12 de Abr. de 2019** a **30 de Junho. de 2019**

Espécie/linhagem: **Betta (*Betta splendens*)** Nº de animais: **1180**

Peso: **1,50g** Idade: **4 meses** Sexo: **Macho** Origem: **Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura DBA/UFV, CPF: 484991966-91 Endereço: Anexo do CCB 2 campus de Viçosa UFV Responsável: Prof Jener Alexandre Sampaio Zuanon**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**of adult males of *Betta splendens* using clove oil, *Syzygium aromaticum*, as sedative**", protocol nº **025/2019**, under the responsibility of **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Mar, 28th, 2019**.

Finality: **Research** **Education**

Duration of the Project: from **Apr, 12th, 2019** to **Jun, 30th, 2019**.

Species / strain: **Siamese fighting fish (*Betta splendens*)** Nº of animals: **1180**

Weight: **1,50g** Age: **4 months** Sex: **Male** Source: **Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura DBA/UFV, CPF: 484991966-91 Endereço: Anexo do CCB 2 campus de Viçosa UFV Responsável: Prof Jener Alexandre Sampaio Zuanon**

Luciana Navajas Rennó

Luciana Navajas Rennó

Coordenadora da CEUAP/UFV