



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA MESTRADO EM RECURSOS
AQUÁTICOS E PESCA

LUIS FERNANDES DA SILVA FARIAS JUNIOR

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA A ESPÉCIE ACARA PRETO (*Cichlasoma
bimaculatum*)**

São Luís

2017

LUIS FERNANDES DA SILVA FARIAS JUNIOR

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA A ESPÉCIE ACARA PRETO (*Cichlasoma
bimaculatum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Riedel Porto Carreiro

São Luís

2017

LUIS FERNANDES DA SILVA FARIAS JUNIOR

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA A ESPÉCIE ACARA PRETO (*Cichlasoma
bimaculatum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, para obtenção do título de Mestre em Recursos Aquáticos e Pesca.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Riedel Porto Carreiro

Doutor em Engenharia de Pesca
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Profa. Dra. Erivânia Gomes Teixeira

Doutor em Engenharia de Pesca
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof. Dr. Weverson Scarpinni Almagro

Doutor em Ciência Animal
Instituto Federal do Maranhão (IFMA)

Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves

Doutora em Biotecnologia
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter vivenciado essa nova etapa de crescimento tanto pessoal quanto profissional. Agradeço a minha família que em todo o trajeto esteve ao meu lado minha mãe grande apoiadora, amiga e fortaleza na qual sei que sempre terei um porto seguro, minhas irmãs que me ajudaram e me deram força nessa jornada as vezes tão incerta . Sou grato a minha amiga/namorada/noiva por sempre estar ao meu lado com palavras gentis e companheirismo, ao longo desses dois anos vi nela a pessoa com quem quero passar o resto da vida. Agradeço imensamente aos professores do Programa de pós graduação em recursos aquáticos e pesca, todos sem exceção contribuíram para o meu crescimento e me expandiram os horizontes. E por último e não menos importante agradeço a FAPEMA pela ajuda, pelo apoio e pelo incentivo, você me ajudou a realizar sonhos e conhecer novos lugares, proporcionou que eu pudesse me dedicar aquilo que amo fazer e por isso lhe sou muito grato.

RESUMO

Avaliou-se o do óleo de cravo em Acará-preto (*Cichlasoma bimaculatum*). Foram testadas as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L do anestésico, exposição individual para cada animal por dosagem e cinco repetições para cada concentração. Foram realizados ensaios com exemplares de Acará-preto para determinar a dose adequada de anestesia para diferentes procedimentos na aquicultura, como a biometria, triagens, transportes, coleta de sangue; para analisar se baixas concentrações do anestésico induzem a sedação; e se o comportamento e a sobrevivência dos peixes são afetados pelo anestésico. O eugenol é um agente anestésico que apresenta baixo custo de aquisição, baixa toxicidade que não representa riscos ao meio ambiente nem para os manipuladores já que não representa risco aparente de intoxicação, assim, avaliou-se a eficiência anestésica do eugenol, estimando-se a dose ideal, (através dos tempos para indução e recuperação anestésica), as concentrações letais e o tempo de concentração letal. Os testes se basearam em banhos de imersão. Os tempos de indução à anestesia e da recuperação foram registrados. Não ocorreram mortalidades durante e 72 h após o experimento. As concentrações de 40 e 50 mg/L de óleo de cravo testadas, induziram os acaras à anestesia profunda. A concentração de 10mg/L foi a menos eficiente em levar os espécimes a um estado de anestesia mais adequado. A concentração de 50mg/L provocou em alguns casos respostas adversas o que talvez possa ser atribuído a pureza do álcool utilizado.

Palavras-chave: Anestésico. Concentrações. *Cichlassoma Bimachulatum*. Eugenol.

ABSTRACT

The oil of clove was evaluated in Acará-preto (*Cichlasoma bimaculatum*). The concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 mg / L of the anesthetic were tested, individual exposure for each animal per dosage. Acara-preto specimens were tested to determine the appropriate dose of anesthesia for different aquaculture procedures, such as biometrics, screening, transport, blood collection; to analyze whether low anesthetic concentrations induce sedation or have a stressful effect; and whether the fish's behavior and survival are affected by the anesthetic. The eugenol is an anesthetic agent that presents low acquisition cost, low toxicity to the animals and their manipulators, thus, the eugenol anesthetic efficiency was evaluated, estimating the ideal dose (through the times for induction and anesthetic recovery) , lethal concentrations and lethal concentration time. The tests were based on immersion baths. Induction times for anesthesia and recovery were recorded. No mortality occurred during and 72 h after the experiment. The concentrations of 40 and 50 mg / L of clove oil tested, induced the acaras to deep anesthesia. The concentration of 10mg / L was less efficient in taking the specimens to a more adequate state of anesthesia. The concentration of 50mg / L caused in some cases adverse responses which may be attributed to the purity of the alcohol used.

Keywords: Anesthetic. Concentrators. *Cichlassoma Bimachulatum*. Eugenol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Natureza do método e técnica.....	14
Figura 1	Esquema de demonstração da dinâmica de transmissão de impulsos nervosos	17
Quadro 2	Estágios de anestesia e de recuperação descritos por Iwama et al. (1989) para a truta arco-íris (<i>Salmo gairdneri</i>).	19
Figura 2	Estrutura química do eugenol e isoeugenol	23
Figura 3	Pesagem do exemplar de <i>Cichlasoma bimaculatum</i>	27
Figura 4	Medição do exemplar de <i>Cichlasoma bimaculatum</i>	28
Figura 5	Termômetro digital utilizado na aferição da temperatura durante o experimento	29
Figura 6	Acará preto (<i>Cichlasoma bimaculatum</i>) anestesiado.....	29
Figura 7	Tempo de Indução e Recuperação pelo Eugenol.....	32
Figura 8	Demonstrativo gráfico do Tempo de Indução	33
Figura 9	Análise do grupo controle e a glicose	34
Figura 10	Análise do grupo controle e a glicose	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Anestésicos na Aquicultura	12
2.1.1	Aplicação de anestesia	13
2.1.2	Fatores que influenciam a anestesia.....	15
2.2	Mecanismo de anestesia e reações fisiológicas	16
2.3	Estágios de anestesia	18
2.4	Anestésicos	20
2.5	Transporte de peixes	20
2.6	Estresse	21
2.7	Óleo de cravo	22
2.8	<i>Cichlasoma bimaculatum</i>	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Local do experimento e período pré-experimental	26
4.2	Anestésico	27
4.3	Indução e recuperação do anestésico	28
4.4	Análise estatísticas	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Indução e recuperação de anestesia	31
5.2	Efeitos fisiológicos da eugenol	34
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Adaptados exclusivamente ao meio aquático, os peixes compreendem cerca de 25.000 espécies, um número maior do que o somatório de todas as espécies de vertebrados terrestres conhecidos (Z AHL et al., 2009). Desse montante, apenas umas poucas espécies são viáveis para o cultivo utilizadas na produção aquícola. Um dos principais requisitos para o bom desenvolvimento da atividade aquícola é o conhecimento adequado da biologia das espécies utilizadas para o cultivo e para o melhor domínio das técnicas de cultivo mais indicadas. O entendimento da fisiologia das espécies, do funcionamento dos sistemas orgânicos, suas interações e respostas em relação ao meio de cultivo, sabendo-se as diferentes alterações ambientais e os métodos de criação, garantem o estabelecimento das melhores condições de cultivo das espécies.

Atualmente, nos modernos sistemas de aquicultura intensiva e super intensiva, os peixes são criados em altas densidades utilizando grandes quantidades de ração. Sob estas condições eleva-se a concentração de amônia e produtos oriundos do metabolismo, provinda dos excrementos ou da excreção de nitrogênio, concomitantemente com a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido (WAGNER et al., 2009). Para Rotta (2010), o tipo de manejo realizado com os peixes, a degradação da matéria orgânica do viveiro, a utilização de oxigênio dissolvido por uma carga excessiva de peixes no viveiro e a fermentação provocada por este tipo de cultivo, levam a um ambiente com péssimas condições para o crescimento e desenvolvimento dos peixes, levando-os a um estado crônico ou crítico de estresse.

Desde a década de 1970, estudos envolvendo o estresse dos peixes têm sido frequentemente realizados no campo da fisiologia (ROSS; ROSS, 2008). No ambiente, a resposta ao estresse pode ser vista como a capacidade dos peixes mobilizarem as reservas de energia de forma a evitar ou vencer imediatamente situações de ameaça (IWAMA et al., 1994). Em piscicultura intensiva, a situação de estresse está constantemente presente e pode afetar o desempenho produtivo dos peixes, prejudicando o estado de saúde e aumentando a suscetibilidade a doenças (VIDAL et al., 2008).

A elevada produtividade na criação de animais usualmente não é compatível com as práticas que visem o bem-estar dos mesmos sendo ainda menos relevantes quando se tratando das práticas na aquicultura (VIDAL et al., 2008). Talvez devido a esta rápida expansão da aquicultura, o bem-estar dos peixes em cativeiro tem adquirido uma maior preocupação (LAWRENCE, 2008; ROSS; ROSS, 2008; ELLIS et al., 2012). Para além de ser uma questão importante para a indústria, na perspectiva da percepção pública, do marketing e

da aceitação do produto, também é relevante em termos de eficiência de produção, qualidade e quantidade (ASHLEY, 2007). Todas as atividades que implicam a manutenção de peixes vivos, como estabelecimentos de aquicultura, centros de investigação ou centros de animais, requerem algumas práticas regulares de manuseamento dos peixes. Nestas atividades estão incluídas amostragens biológicas, triagens, vacinação, transporte, entre outros. Estes procedimentos são frequentes, podendo causar grandes períodos de stress, tendo um impacto negativo no crescimento e na saúde dos peixes (PERDIKARIS et al., 2010). Neste contexto, o uso de anestésicos é uma ferramenta útil, pois não só ajuda a impedir danos físicos nos peixes e nos operadores, como atenua o stress durante os processos de manipulação e facilita o seu manuseamento (ROSS; ROSS, 2008).

Com o objetivo de minimizar possíveis efeitos desfavoráveis que as técnicas para a obtenção de uma alta produtividade possam provocar aos animais, recomenda-se o uso de produtos atenuantes ou anestésicos, de forma que seu uso atenda as diversas questões éticas que visam a prevenir ou evitar o sofrimento dos organismos aquáticos nas diferentes fases de manejo (HANAWA et al., 1998; ROSS, 2009). Práticas intensas de manejo, como o transporte, povoamento, mudanças na qualidade da água, temperatura e mesmo salinidade favorecem uma série de fatores estressantes aos peixes (VIDAL et al., 2008).

O estresse tem seus principais efeitos com o início da liberação de corticoides, lactato e catecolaminas no sangue, substâncias essas que alteram a qualidade da carne ou mesmo o desenvolvimento do organismo visto que animais estressados apresentam péssima conversão alimentar e são mais suscetíveis a infecções (VIDAL et al., 2008). Essas substâncias liberadas no sangue também influenciam diversas alterações corporais como inibição do crescimento e mesmo distúrbios no ciclo reprodutivo (IWAMA et al., 2010).

Vários estudos demonstram que o uso de produtos anestésicos reduz os efeitos do estresse e por consequência a liberação de corticoides e lactato na corrente sanguínea durante o manejo, atuando no eixo hipotálamo-hipofise-inter-renal e mitigando as respostas do organismo ao estresse (IWAMA et al., 2010). Sendo assim estudos aprofundados dessas substâncias mostram-se fundamentais para um considerável aumento na qualidade do manejo empregado.

Em organismos aquáticos os anestésicos geralmente são administrados por imersão em soluções diluídas que são absorvidos principalmente pelas brânquias (IWAMA et al., 2010). Em peixes que apresenta respiração aérea obrigatória como e o caso do *Arapaima gigas* não é utilizada a técnica de imersão pois o animal pode afogar-se sendo então utilizado a aspersão diretamente nas brânquias (HOWE, 1999).

O anestésico selecionado deve atender a critérios como a eficácia do produto para a espécie em questão, custo e disponibilidade de aquisição, segurança no uso tanto para quem administra quanto para o organismo a ser administrado, possíveis efeitos colaterais, grau de toxicidade e se o mesmo não será bio acumulado no organismo ministrado (IVERSEN et al., 2003). Por conseguinte, e deveras necessário, identificar quais as concentrações e qual anestésico se adequa melhor a cada espécie e a cada estágio de desenvolvimento da mesma, evitando assim alterações metabólicas que possam ocasionar o óbito do organismo em questão ou interferir em seu crescimento e reprodução, além de evitar superdosagens e o desperdício do produto usado minimizando os custos na produção (ROUBACH; GOMES, 2001).

A ausência de estudos sobre as concentrações de anestésico, concentração ideal e tempo de exposição para cada espécie são fatores limitantes na aplicação do uso destes produtos na aquicultura (CHATZIFOTIS et al., 2010). Dessa forma, a análise da relação entre a concentração do anestésico e o tempo de indução bem como a espécie a ser submetida ao tratamento apresenta especial relevância no que concerne a escolha do produto mais eficaz e indicado.

De acordo com Vidal et al. (2008), o coeficiente de absorção de cada anestésico está intimamente relacionado com as propriedades físico químicas do mesmo, a fatores respiratórios, a quantidade de sangue irrigando as brânquias o que influencia de forma preponderante o tempo de indução e recuperação. A eficácia do anestésico também é diretamente influenciada por fatores como idade do organismo, tamanho, nutrição, sexo, temperatura da água entre outros fatores ambientais (Z AHL et al., 2009).

O agente anestésico mais indicado ou considerado ideal deve produzir o estágio de anestesia profunda no tempo máximo de dez minutos com tempo de recuperação máxima de até cinco minutos (MEYER, 2013), deve ser eficaz em baixas concentrações e apresentar elevado grau de toxicidade somente em doses muito acima das recomendadas.

Muitas são as substâncias utilizadas como anestésicos para peixes. No Brasil não há legislação que regulamente o uso de anestésicos em organismos aquáticos por isso são adotadas as diretrizes da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) no que concerne ao uso de anestésicos sendo que a mesma libera o uso de MS222 em peixes destinados ao consumo (CHATZIFOTIS et al., 2010). Os anestésicos mais comuns empregados no país são o MS22 (tricaina metano sulfonato), a benzocaina (ethyl-p-aminobenzoato), a quinaldina (2-4 metilquinolina) (GABRIEL, 2011). De acordo com a FAO (2011) animais submetidos a anestésicos só podem ser consumidos após um período de vinte

e um dias do dia de contato com o produto. Como o MS222 não é produzido no Brasil, seu custo de aquisição é um tanto quanto maior em relação a outros anestésicos mais comuns no mercado nacional, o que por sua vez dificulta a utilização dessa substancia no território.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anestésicos na Aquicultura

É necessário buscar meios seguros e de fácil aquisição para a anestesia de organismos aquáticos no Brasil, contribuindo com as autoridades responsáveis pela regulamentação desse tipo de prática no intuito de fomentar análises que visem a melhor aplicação e entendimento da ação desses fármacos e seus mais diversos usos nas rotinas de manejo e transporte desses organismos (FACANHA; GOMES, 2005).

Uma das alternativas mais viáveis em termos econômicos e de disponibilidade no mercado é o eugenol, que é um extrato natural eficaz, segura e de baixo custo, que não representa riscos ao meio ambiente nem para os manipuladores já que não representa problemas aparente de intoxicação (ACERETE et al., 2004; IVERSEN et al., 2003; CHO, 2010).

O composto fenólico aromático extraído da *Eugenia aromática* conhecido como eugenol (4 – alil-metoxifenil) e uma substância que atua como amortecedor do sistema nervoso central (DUNCAN et al., 2013) cuja a concentração encontra-se em torno de 60% a 90% do óleo essencial, obtido através da destilação das flores e folhas de *E. aromática*. O eugenol é utilizado na odontologia como antisséptico e analgésico além de suas propriedades anestésicas.

Algumas pesquisas utilizando eugenol como anestésico para peixes comprovam sua eficácia e sua adequação a organismos aquáticos em geral Wagner et al. (2012), concluíram, trabalhando com o eugenol como anestésico para *Paractus mesopotâmicos* que ele seria um anestésico eficaz e indicado na substituição de benzocaina. Para juvenis de *Oreochromis niloticus* concentrações de 25mg/L, 50mg/L, 75mg/L e 100mg/L tendo sido a concentração de 50mg/L a mais indicada para o processo de indução no que se refere ao manejo dos juvenis, com taxas baixíssimas de mortalidade em comparação ao manejo sem o anestésico (VIDAL et al., 2008).

Filiciotti et al. (2012), testaram o tempo de indução, resposta a fatores estressantes, presença de glicose e cortisol e análise sensorial do file de *Oreochromis niloticus* e observaram que os peixes anestesiados com 50mg/L apresentaram níveis significativamente mais baixos do cortisol plasmático e do lactato muscular que peixes que não passaram pela indução presentes no grupo controle, mostrando ser o eugenol um bom inibidor do aumento do estresse durante o manejo. No entanto, o teste sensorial mostrou que o eugenol modifica

levemente o sabor do file de peixes submetidos a indução o que indica que os animais submetidos ao processo devem respeitar o mesmo período de 21 dias recomendado pela FAO (2008) no uso de MS222. Estes fatos mostram que a falta de estudos relacionados ao eugenol, como, por exemplo, a determinação de um tempo de espera após a indução para o consumo adequado e as concentrações e respostas de cada espécie ao tratamento.

2.1.1 Aplicação de anestesia

O termo anestesia provem do grego, termo que em sua essência significa adormecer, amortecer, restringir a sensibilidade (ROSS, 2009). Em geral, a anestesia vem sendo referida como um agente externo causador de estados entorpecentes capazes de provocar total ou parcial perda dos sentidos relacionados à percepção de dor ou sensibilidade tátil local, isso tudo proveniente de um estado de depressão do sistema nervoso, ou seja, seu temporário amortecimento (FRISCH, 2000).

O anestésico vem sendo utilizados em peixes, desde o começo do século passado. A aplicação e desenvolvimento dessa técnica deriva em grande parte da medicina humana e veterinária e foi aplicada em peixes através de testes de tentativa e erro (ZAHL, 2010).

No início os anestésicos eram utilizados quase que exclusivamente para o manuseio (manejo), no entanto, a medida que foi conhecendo-se melhor a fisiologia de cada espécie e a preocupação com o bem-estar animal foi evidenciando-se nos mais variados ramos de criação animal, o âmbito da utilização de anestésicos tem sido ampliado. Na aquicultura, o uso de anestésicos atualmente é empregado visando a diminuição do estresse provocado pelos procedimentos inerentes a essa atividade, como transporte, biometria, triagem, vacinação, marcações eletrônicas e reprodução (COOKE et al., 2004; MYLONAS et al., 2005).

De acordo com o objetivo almejado, o anestésico pode induzir vários estágios, como sedação, narcose e mesmo a morte (ROSS, 2001; COYLE et al., 2009). Em termos mais amplos a sedação é um estágio que precede a anestesia onde nota-se uma progressiva redução da sensibilidade, mas que, no entanto, não acomete nenhuma perda sensorial ou de equilíbrio, em suma, as reações do organismo em sedação são mais lentas que em seu estado normal (ZAHL et al., 2009). A anestesia profunda pode ser descrita como uma perda mais geral da percepção sensorial, apresentando também certa restrição motora e alívio na percepção da dor (ZAHL et al., 2010). A superdose de anestésico provoca a morte por colapso medular, estágio no qual os impulsos nervosos ficam comprometidos a ponto de sistemas autônomos

começarem a falhar, porém a superdosagem é considerada uma maneira aceitável de eutanásia (NEIFER; STAMPER, 2009).

O intuito do uso de anestésicos, concentra-se na redução de mobilidade dos peixes, tornando assim possível a realização de vários procedimentos causando o mínimo possível de injúrias físicas e reações bioquímicas de estresse ao animal. Sendo assim o principal foco do uso de anestésicos é de fato um melhor desempenho no que se refere a manejo, com o mínimo de ocorrência de danos ao organismo, de forma a salvar guardas de possíveis sequelas que comprometam suas funções biológicas e desenvolvimento (COOKE, 2007). No entanto a própria anestesia pode configurar um fator de estresse para os peixes (IWAMA et al., 1994). Por esta razão, a determinação das concentrações mais apropriadas de anestésicos indicados para cada espécie e fase de desenvolvimento dos peixes bem como as condições ambientais onde estes encontram-se é de grande importância para pesquisas que visem o uso de anestésicos.

O ponto de ação dos anestésicos no sistema nervoso de peixes não é muito conhecido, a maior parte das metodologias aplicadas provém de estudos desenvolvidos a partir de animais terrestres e mesmo humanos (ZAHN et al., 2012). Geralmente os procedimentos de anestesia profunda agem através da depressão generalizada do sistema nervoso central, produzida através da ação direta do fármaco nos axônios inibindo a liberação e recepção de neurotransmissores ou por alterações na permeabilidade das membranas ou mesmo pela combinação dos dois fatores (ROSS; ROSS, 2008) como podemos observar na tabela abaixo. A liberação de neurotransmissores GABA, Ácido gama-aminobutírico (IUPAC: 4-aminobutanóico [ácido]) e alterações nos canais de sódio, potássio e cálcio são os mais referenciados na utilização de anestésicos (SOARES et al., 2012).

Quadro 1 – Natureza do método e técnica

NATUREZA DO METODO	TÉCNICA
Física	Hipotermia Estimulação Elétrica Acupuntura Pressão Local
Química	Inalação Parenteral: <ul style="list-style-type: none"> • Intravenosa • Intraperitoneal • Intramuscular Oral Retal
Psicológica	Hipnose

Fonte: Ross e Ross (2008).

2.1.2 Fatores que influenciam a anestesia

A efetividade de um anestésico pode variar não só entre diferentes espécies mas também dentro de uma mesma espécie (WAGNER et al., 2008). Princípios biológicos como idade, peso, porcentagem de gordura corporal fazem com que o espécime responda de maneira diferente a cada concentração de anestésico (COYLE et al., 2009; ROSS et al., 2010). Essa resposta pode ainda ser influenciada por fatores ambientais e parâmetros físico químicos da água como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade (GREEN et al., 1979; ZAHL et al., 2009).

A relação entre o peso do peixe e a concentração de anestésico mais indicada nem sempre é clara ou bem definida (TSANTILAS et al., 2006). Alguns estudos apontam que não há uma clara relação entre o peso e a concentração indicada e que não existe nenhuma relação entre esses dois fatores e os tempos de indução e recuperação da anestesia (PERDIKARIS et al., 2010), enquanto outros estudos mostram que essa relação existe (ZAHL, 2010). Perdikaris et al. (2010), demonstram em um de seus estudos, o tempo de indução e recuperação com eugenol para o dourado (*Carassius auratus*) que o tempo de indução tem uma relação direta com o peso, onde peixes maiores necessitam de um tempo maior para atingir os estágios de indução. Resultados semelhantes foram obtidos por Zahl et al. (2009), que demonstraram que o aumento no peso total da espécie de bacalhau do atlântico também influenciou no aumento do tempo para a indução utilizando-se o anestésico MS-222 e a benzocaina. Ambos os pesquisadores justificam tal ocorrência dessa relação afirmando que a taxa de absorção do anestésico pelas brânquias de peixes menores é significativamente maior que em peixes maiores o que afeta diretamente o tempo de indução para cada classe de tamanho, também sugerem que o metabolismo tem fundamental importância na taxa de absorção e excreção do anestésico o que também tem influência direta.

Foi ainda observado que o hábito de cada espécie influencia diretamente os tempos e os estágios de indução e recuperação, visto que peixes mais ativos atingem estágios de indução mais rapidamente que espécies de comportamento mais letárgico (COYLE, 2009). Este fato pode estar relacionado com a atividade de cada peixe, onde o peixe ativo absorve mais rápido o anestésico que o peixe de comportamento mais sedentário (COOKE, 2007). Animais enfermos ou debilitados são muito mais suscetíveis a aplicação de anestésico (ROSS, 2008), assim é muito importante que a eficácia do anestésico seja determinada em espécimes saudáveis.

A temperatura é o fator que mais influência no tempo de indução visto que os peixes não regulam sua temperatura corpórea de forma autônoma, o que afeta diretamente o metabolismo (SMALL et al., 2004). Assim este parâmetro desempenha um papel de fundamental importância no processo de indução o qual deve ser levado sempre em consideração visto que influencia na absorção e eliminação do anestésico (ZAHL et al., 2009). Com a maioria dos anestésicos são necessárias doses mais altas ou tempos de indução maiores em caso de temperaturas muito baixas, pois a taxa de absorção do anestésico decai muito (MYLONAS, 2005).

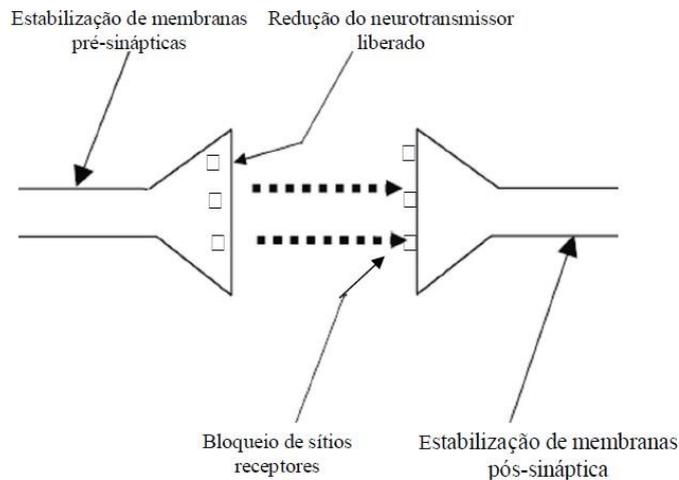
O pH de uma solução anestésica também tem relação direta com sua eficácia, possivelmente afetando a relação de moléculas carregadas para as não carregadas (NEIFER; STAMPER, 2009). Em geral quanto menor o pH menos eficaz será o anestésico pois o aumento na ionização afeta sua absorção (ZAHL et al., 2010). A quinaldina é o exemplo mais conhecido de anestésico que perde sua eficácia com pH mais baixos (COYLE et al., 2009). Alguns anestésicos por terem tendências mais ácidas necessitam de uma solução tampão para neutralizar seu pH (SUMMERFELT et al., 2010). Em água salgada pelo pH ser mais elevado, verifica-se uma maior capacidade de tamponamento natural, visto que os íons de sódio e cálcio tendem mais para o básico, em comparação a água doce onde a presença de matéria orgânica em decomposição e íons de amônia e ureia tendem mais para o ácido (NEIFER; STAMPER, 2009).

2.2 Mecanismo de anestesia e reações fisiológicas

Segundo Ross e Ross (2008), os anestésicos são administrados via imersão dos peixes em solução anestésica. A solução anestésica é captada pelas brânquias, principal rota de absorção e eliminação de anestésicos, difunde-se para o sangue, que o conduz até o sistema nervoso central (SNC) (ROSS et al., 2009).

Através da atuação nos axônios neuronais (Figura 1), os anestésicos deprimem o Sistema Nervoso Central (SNC) ao atingi-lo (COOKE et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre o modo preciso de ação dos anestésicos em peixes (SUMMERFELT et al., 1990). Acredita-se, porém, que este seja similar à anestesia inalatória utilizada em animais terrestres (UCAR et al., 2010). Em geral, esta ação é acompanhada pela estabilização das membranas neuronais, incluindo depressão das estruturas pré-sinápticas, com consequente redução na quantidade de neurotransmissor liberado pelo impulso nervoso, assim como depressão dos receptores pós-sinápticos (ROSS; ROSS, 2008).

Figura 1 - Esquema de demonstração da dinâmica de transmissão de impulsos nervosos.



Fonte: Science (2010)

A capacidade de interferir sobre o eixo HHI (Hipotálamo – Hipófise – Inter-renal) como mitigador das respostas ao estresse tem sido um parâmetro norteador para a escolha dos anestésicos (RIBEIRO et al., 2013). Diversos estudos comprovam que a utilização de sedativos reduz a concentração de corticoides (cortisol) e catecolaminas na circulação sanguínea, durante manejos estressantes (WEBER et al., 2011).

O estresse em animais vertebrados provoca alterações administradas por centrais sensoriais especializadas, as quais canalizam a informação prontamente na região do hipotálamo, incitando a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e ativando o eixo HHI (Hipotálamo – Hipófise – Inter-renal), com estimulação da propagação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela glândula pituitária. Este hormônio atua no tecido inter-renal, que responde com a liberação de corticoides na corrente sanguínea (OLSEN; EINARSDOTTIR; NIELSSEN, 1995; SHAVIT et al., 2005). Dessa maneira, os diversos dispositivos químicos podem atuar de várias formas: barrando os receptores da adrenalina (inibindo seu efeito), impedindo a ação dos transmissores sensoriais do hipotálamo, ou agindo diretamente nas células inter-renais (bloqueando os receptores de ACTH) e diminuindo a liberação de corticoides (GERWICK; DEMERS; BAYNE, 1999).

A redução do movimento muscular durante a anestesia ocorre em função de um efeito direto do anestésico sobre os nervos, na musculatura lisa e no músculo cardíaco (WEBER et al., 2009). Esse efeito pode causar consequências perigosas aos peixes, sobretudo quando estiver relacionado ao distúrbio cardíaco (ROTHWELL et al., 2004).

O batimento cardíaco tem uma frequência controlada por diversos fatores metabólicos, os quais podem sofrer interferência na presença de agentes anestésicos, levando a um quadro de arritmia cardíaca (SOARES et al., 2012). Esses agentes químicos bloqueiam nervos, incapacitando a contração muscular, o que prejudica a circulação sanguínea (HILL; DAVISON; FORSTER, 2002; ROTHWELL et al., 2004).

O movimento branquial é influenciado por inúmeros fatores, tais como íons reguladores, hormônios, nervos e batimento cardíaco (READMAN et al., 2013). As brânquias cessam o movimento à medida que o químico atinge os nervos e o coração, reduzindo a circulação sanguínea e levando à parada respiratória (HILL; DAVISON; FORSTER, 2002). Esse processo desacelera o metabolismo do peixe, reduzindo a sua exigência por oxigênio (COOKE et al., 2004).

A avaliação do grau de insensibilização em peixes pode ser feita mediante observação do comportamento do animal, tanto para a indução, quanto para a recuperação. A aplicação desta metodologia é de grande importância quando se deseja medir a mortalidade posterior à recuperação, além de não causar nenhum estresse adicional ao animal durante o processo de anestesia. O procedimento é utilizado pela maioria dos pesquisadores, com pequenas adaptações para diferentes objetivos (BURKA et al., 1997; KEENE et al., 1998; HOSKONEN; PIRHONEN, 2004).

2.3 Estágios de anestesia

A exposição de peixes a agentes anestésicos causa diferentes respostas de acordo com a espécie, peso ou idade do espécime em questão, assim como os fatores ambientais já citados (POTTINGER et al., 2008). Estas respostas apresentam, geralmente, uma sequência previa e progressiva de comportamentos. Alguns estudiosos caracterizam tais respostas como desenvolvendo diferentes escalas e estágios de anestesia (IWAMA et al., 2009), outros pesquisadores adaptam os estágios já conhecidos para melhor se enquadrarem na espécie estudada e para as condições físico químicas e ambientais em que o estudo é desenvolvido (KING et al., 2005; AKBULUT et al., 2012).

Os estágios descritos por Summerfelt e Smith (1990) são normalmente os mais utilizados em trabalhos com anestésicos aplicados a peixes. De um modo geral, Iwama (2009), descreveu as respostas comportamentais de cada espécie de peixe em sete estágios de indução e três estágios de recuperação como visto no quadro 2.

Quadro 2 - Estágios de anestesia e de recuperação descritos por Iwama et al. (1989) para a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*).

ESTÁGIO	ANESTESIA
I - Normal	Peixes com reações normais a estímulos externos, batimentos operculares regulares, reação muscular normal
II – Sedação Leve	Peixes com reações estímulos externos, movimentos reduzidos, batimentos operculares mais lentos, equilíbrio normal
III – Sedação Profunda	Perda total de reação a estímulos externos exceto forte pressão, leve queda do movimento opercular, equilíbrio normal
IV – Narcose	Perda parcial do tônus muscular, natação errática, aumento dos movimentos operculares, reação a forte estímulos tátil ou vibração
V – Anestesia Profunda	Perda total de tônus muscular, perda total de equilíbrio, batimento opercular lento porem regular
VI – Anestesia Cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo, movimentos operculares lentos e irregulares, batimentos cardíacos lentos, perda total de reflexos
VII – Colapso Medular	Parada cardíaca, parada na respiração, eventual morte
RECUPERAÇÃO	
I	Corpo imóvel, retornam os movimentos operculares
II	Movimentos operculares se regularizam, recuperação dos movimentos natatórios
III	Recuperação do equilíbrio, estado pré anestesia aparente, estado normal reestabelecido

Fonte: Iwama et al. (1989).

O andamento progressivo de indução e recuperação são normalmente divididos em diferentes estágios. Em animais terrestres, os indicadores clínicos habitualmente utilizados para avaliar as diferentes etapas de anestesia incluem o comportamento, a atividade, as reações córneas e tamanho da pupila, tônus muscular, reflexos, respiração, frequência cardíaca e pressão arterial (Z AHL et al., 2013).

Como a grande parte destes indicadores são difíceis de mensurar nos peixes, pode ser difícil diferenciar um estágio para o outro mesmo em uma mesma espécie, principalmente em casos em que a indução ocorre de forma rápida. Nos peixes, os estágios de indução e recuperação são normalmente descritos a partir de mudanças na natação e batimentos operculares, bem como no estado do equilíbrio apresentado pelo animal e sua resposta a estímulos externos (MONFORT et al., 2010). Mas dependendo da espécie essas características podem não ser tão aparentes ou mesmo haver a ausência de algum dos estágios de anestesia durante a indução, de forma a ser ressaltada a importância de estudos aplicados a avaliação e respostas de cada espécie aos diferentes tipos de anestésicos disponíveis (SMALL et al., 2010).

2.4 Anestésicos

A manipulação de peixes na aquicultura ou em laboratórios de pesquisas requer em algum momento a sedação dos animais. Para o mesmo existe uma grande variedade de substâncias anestésicas que permitem a sua realização (ROSS et al., 2010).

Os anestésicos químicos mais comuns utilizados em peixes são o MS-222, benzocaina e o óleo de cravo (eugenol) (KREIBERG, 2008).

O MS-222 é o anestésico mais comumente utilizado em peixes pelo fato de ser aprovado pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos bem como na União Europeia, no Brasil não há legislação vigente que regulamente o uso de anestésicos de qualquer natureza em organismos aquáticos em geral. De acordo com Randman et al. (2004), o fenoxietenol é amplamente utilizado na Europa ocidental porém o eugenol vem sendo cada vez mais utilizado por ser um produto de origem natural e apresentar grau de toxicidade menor em relação aos anestésicos de origem sintética, além de ter uma ampla disponibilidade no mercado e seu preço ser mais acessível.

2.5 Transporte de peixes

O transporte é uma prática usual em sistemas de criação de peixes (PIPER et al., 1982; CARMICHEL et al., 2001). Nas regiões norte e nordeste do Brasil, o transporte de juvenis e mesmo alevinos vem aumentando consideravelmente e as principais finalidades são o comércio de peixe vivo em feiras para consumo, fornecimento para fazendas e sítios de pesque-pague e formação de plantel de reprodutores (MOLINERO et al., 2000). A tolerância

ao transporte está diretamente relacionada a resiliência de cada espécie de peixe, sua capacidade em adaptar-se a mudanças e sua capacidade de recuperação. Um dos principais requisitos para a escolha de uma espécie é sua rusticidade, ou seja, sua capacidade de resistir e recuperar-se do estresse imposto pelo manejo ou mudanças físico-químicas no ambiente de cultivo.

O transporte é um dos principais fatores estressantes no cultivo, para Cardenas (2010) o estresse causado pela captura e o transporte torna os peixes muito susceptíveis a infecções e lesões além de favorecer também o ataque de possíveis organismos parasitas. Estudos indicam que o estresse é muito presente no processo de captura dos organismos, assim como no manejo para o carregamento e primeira hora durante o transporte do que durante as horas seguintes do traslado (DUNCAN et al., 2008). As técnicas e procedimentos utilizados durante a etapa de despesca são muito importantes para o sucesso do transporte em si. Uma ampla gama de técnicas como análises sanguíneas para a presença de hormônios que indiquem o estresse e métodos vem sendo desenvolvidos e testados visando minimizar esses efeitos negativos causados pela captura e manejo (CHAIEB et al., 2007). Emata (2008) diz que o transporte de peixes tem sido facilitado pelo emprego de técnicas como o jejum para transporte, uso de dosagens leves de anestésico ou mesmo a adição de sal durante o procedimento.

O jejum alimentar que precede o transporte é uma importante etapa pois reduz o consumo de oxigênio, a excreção de amônio e a produção de gás carbônico pelos peixes. É recomendado um jejum de 48 horas antes do transporte, isso propicia uma rápida recuperação por parte dos organismos transportados, visto que esses recuperam-se mais imediata do estresse, além do que os peixes depurados entram no meio de transporte com o trato digestivo praticamente vazio reduzindo muito o impacto do material fecal na água de transporte e seu contato com a epiderme dos peixes o que por si só reduz consideravelmente o aparecimento de infecções provenientes de lesões durante o transporte (JARBOE, 1999)

2.6 Estresse

O conceito de estresse indica uma condição na qual o organismo é incapaz de manter uma condição física e metabólica considerada normal dentro do seu espectro usual de atividades biológicas devido sobretudo aos fatores tidos como estressantes ou estressores (MELLO, 1999). O estresse também pode ser considerado um conjunto ou grupo de respostas não específicas mas correlatas a situações que ameaçam sua homeostase (AKBULUT et al.,

2012). De acordo com Barton (2002), os agentes estressantes ou estressores em peixes podem ser inúmeros, entre os quais estão principalmente:

- a) Natureza física do transporte ou do confinamento;
- b) Natureza química de contaminantes, baixo teor de oxigênio ou variações bruscas de pH;
- c) Presença de predadores ou parasitas e mesmo agentes infecciosos;

Agentes estressores também podem ser classificados quanto a sua duração ou intensidade, sendo moderados de média ou curta duração ou severos de média e longa duração, podendo apresentar diversas respostas no organismo dependendo da sua natureza ou fonte que segundo Cardenas (2010) são.

- a) Resposta prolongada a esses agentes pode provocar nos peixes respostas adaptativas que comprometam suas funções normais de alimentação ou hábitos reprodutivos.
- b) No entanto em prolongada exposição a resposta adaptativa pode ser intensamente negativada por sua natureza ou fonte causando danos ou sequelas irreversíveis ao organismo e mesmo provocando o óbito.

2.7 Óleo de cravo

Os principais anestésicos naturais utilizados em peixes são o óleo de cravo e o mentol (POLI et al., 2003). Tendo o eugenol em sua maior vantagem o fato de ser um extrato natural de fácil absorção e eliminação não sendo de forma alguma nocivo para o meio ambiente ou o organismo anestesiado (ROSS; ROSS, 2008). O óleo de cravo é destilado das flores, caules e folhas de *Syzygium aromaticum* (ou *Eugenia aromaticum*) ou *Eugenia caryophyllata* (CHATZIFOTIS; PANAGIOTIDOU; DIVANACH, 2012). É um líquido marrom com odor e sabor acentuados. O conteúdo total de óleo em cravos (de boa qualidade) chega a 15%. O óleo é constituído, basicamente, por eugenol (70 a 80%), acetato de eugenol (15%) e betacariofileno (5 a 12%) (COOKE et al., 2004).

O eugenol é um composto aromático que está presente nos cravos, canela, sassafrás e mirra (ELLIS et al., 2012). A nomenclatura utilizada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) para o eugenol é *4-Alil-2- Metoxifenol* e o número CAS é 97-53-0, como pode-se observar na figura abaixo. Esta substância tem sido utilizada como anestésico desde a antiguidade, principalmente para ajudar a minimizar dores de dente,

2.8 *Cichlasoma bimaculatum*

O gênero *Cichlasoma* compreende 118 espécies com pelo menos 17 espécies encontradas na América do Sul (FISHBASE, 2016). É considerado um gênero típico da ictiofauna de água doce brasileira, estando presente nos rios dos estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba (KULLANDER, 2004; CHELLAPPA et al., 2009).

Acará-preto (*Cichlasoma bimaculatum*) é um peixe onívoro de água doce tropical, com até 20 cm de comprimento, apresenta coloração que varia do branco-amarelado ao amarelo-avermelhado e possui uma mancha negra no centro do corpo e outra no pedúnculo caudal (FISHBASE, 2016). Também foi identificado como *Aequidens portalegrensis* em 1965 e 1970. É mais frequentemente classificado na família Cichlidae e subfamília de Cichlasomatinae (FISHBASE, 2016). Pode ser encontrada nos canais de água doce e pântanos, com uma região natural que vão desde o rio Amazonas a nordeste e norte da América do Sul. Desde a década de 1960 ele foi identificado no Golfo do México e em diversos condados da Flórida para o norte até Jacksonville.

A espécie *Cichlasoma bimaculatum* ocorre em toda extensão da América tropical, desde a região nordeste do Brasil até o sul da Flórida nos Estados Unidos (FISHBASE, 2016). É uma espécie presente em rios e alagados, sendo muito presente em regiões de baixada e córregos (FISHBASE, 2016). Por sua natureza onívora e muito adaptável (FISHBASE, 2016). Possui reprodução por desova total em período de chuvas, apresenta cuidado parental, tanto macho quanto fêmea protegem a prole, faz seu ninho em substrato, seus ovos ficam aderidos a superfície do substrato até a eclosão das larvas em alguns dias após a postura dos ovos (FISHBASE, 2016).

No estado do Maranhão é muito apreciado, sendo capturado e mesmo cultivado em algumas localidades. Possui potencial para a aquarofilia por apresentar coloração destacável e formas exóticas, como nadadeiras peitorais em tons que variam do amarelo ao azul metálico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter informações sobre a eficácia do anestésico eugenol (óleo de cravo) em *Cichlasoma bimaculatum*.

Para tal pretende-se determinar o tempo de indução para diferentes concentrações de anestésico e sua concentração ideal.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar os tempos/estágios de indução e recuperação anestésicos nas diferentes concentrações testadas.
- b) Determinar a concentração ideal de eugenol para a espécie selecionada.
- c) Contribuir com informações do uso de eugenol como anestésico para peixes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento e período pré-experimental

Os peixes foram mantidos em período pré experimental em um sistema de recirculação, composto de caixas d'água com capacidade de 300 litros. Sistema o qual faz parte do LARAQUA – Laboratório de reprodução de organismos aquáticos, localizado na fazenda escola da Universidade Estadual do Maranhão campus Paulo VI em São Luís. Este estudo decorreu no âmbito de pesquisas realizadas com a espécie *Cichlassoma bimaculatum*, utilizados em diferentes pesquisas no laboratório.

O presente trabalho encontra-se submetido ao comitê de ética e bem estar animal da universidade estadual do maranhão e todos os espécimes utilizados no estudo foram considerados saudáveis, com base em sua aparência externa e atividades. Os espécimes foram selecionados de acordo com seu peso e tamanho, para que todos os peixes a passar pelo processo de indução tivessem tamanho e peso aproximados, resultando em um peso médio de 59,8g e um comprimento médio de 8,3cm. Os espécimes foram mantidos em um tanque retangular de alvenaria com capacidade de 1000L, no período de uma semana antes do experimento propriamente dito, sistema aberto com renovação parcial de água e bons parâmetros de aeração. Durante este período os parâmetros físico-químicos da água foram aferidos sendo o pH da água em torno de 6,0 considerado dentro da faixa ideal para a espécie, índices de oxigênio dissolvido e salinidade também se mantiveram normais. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia até atingirem a saciedade, com ração comercial com fator proteico de 32%. Antes de cada etapa de indução os grupos de peixes passaram por um período de jejum de 24hs.

Figura 3 - Pesagem do exemplar de *Cichlasoma bimaculatum*



Fonte: Registro fotográfico da pesquisa.

4.2 Anestésico

O anestésico utilizado foi o eugenol, com grau de purificação de 99,9% da marca maquira tendo todas as características esperadas da substancia observadas. As diferentes concentrações do anestésico foram misturadas diretamente na água a qual os banhos de imersão foram preparados, o pH da solução estoque manteve-se em 9,2 parâmetro medido com o Medidor Multiparâmentro HANNA – HI 9828. Devido a sua baixa solubilidade em água o eugenol teve de ser diluído em álcool numa razão de 1 para 10 ou seja, uma parte de eugenol para dez de álcool, o álcool utilizado nas dissoluções do eugenol foi o álcool absoluto com pureza 100. Por precaução foram realizados testes preliminares, para averiguar se por si só o álcool 100 induzia os espécimes a algum estágio anestésico, ou por si só poderiam afetar de alguma forma o comportamento dos peixes.

Figura 4 - Medição do exemplar de *Cichlasoma bimaculatum*



Fonte: Registro fotográfico da pesquisa.

4.3 Indução e recuperação do anestésico

Para este experimento foram adotados os parâmetros descritos por Ross et al. (1999), que consistem em sete estágios de indução anestésica e três de recuperação adaptados de sua tabela. O período de indução de anestesia consiste no tempo em que o peixe é exposto ao anestésico até exibir perda total de equilíbrio, perda da maior parte dos movimentos natatórios e parada total ou movimento quase imperceptível dos movimentos operculares. Nesta pesquisa, a concentração eficaz foi definida como sendo a que induz o peixe ao estágio de anestesia cirúrgica de forma a ser perceptível a passagem por todos os estágios em um tempo médio de cinco minutos e que a mesma tenha um tempo de recuperação aceitável dentro do intervalo de dez minutos após a retirada da solução anestésica (ROSS; ROSS, 2008).

Os espécimes de *Cichlassoma bimaculatum*, foram capturados do tanque de aclimatação com ajuda de uma rede e mantidos em uma caixa de isopor de 15 litros com temperatura de 28°C e aeração provida por um soprador com capacidade de 5 L por minuto. Para testar cada concentração de anestésico foram utilizados um peixe para cada concentração estudada. As induções foram realizadas em Becker com capacidade de 1L, estes com aeração constante e temperatura média variando entre 27 a 30 graus celcius.

Figura 5 – Termômetro digital utilizado na aferição da temperatura durante o experimento.



Fonte: Registro fotográfico da pesquisa.

O anestésico utilizado foi testado em diferentes concentrações que a partir de testes prévios ficaram estabelecidos em 10mg, 20mg, 30mg, 40mg e 50mg concentrações de eugenol a ser utilizado no experimento. Cada concentração foi solubilizada em Becker com capacidade de 1L com aeração constante. A temperatura foi aferida e manteve-se constante em 28C. A água foi trocada a cada espécime induzido, dessa forma manteve-se a concentração correta em todas as repetições.

Figura 6 - Acará preto (*Cichlasoma bimaculatum*) anestesiado.



Fonte: Registro fotográfico da pesquisa.

Cada indução individual foi observada e registrada, tendo o tempo sido cronometrado. Todos os espécimes foram monitorados a cada segundo no decorrer da indução. O tempo definido máximo para cada indução foi de 10 minutos de acordo com

parâmetros estabelecidos por ROSS e ROSS, sendo a observação suspensa após este período. Após o peixe atingir o estágio máximo no intervalo de tempo foi removido a mão e colocado em um aquário com capacidade de 10L com água limpa e aerada para ser observada a recuperação. O tempo de recuperação também foi aferido e registrado até o peixe recuperar seus movimentos natatórios e operculares considerados normais.

4.4 Análises estatísticas

Os resultados foram observados como médio e desvio padrão. Todas as concentrações foram incluídas na análise de regressão de variância simples (*one way ANOVA*). A análise de recuperação foi realizada entre a dose e o tempo de recuperação, de forma a determinar o fator de regressão (R^2). A distribuição normal dos resultados foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov's e a homogeneidade através do teste Levene's. Para a comparação dos níveis de glicose foi efetuada uma análise de variância simples (*One Way ANOVA*) com um nível de significância de $\alpha=0.05$. Quando se verificaram diferenças significativas utilizou-se o teste Duncan post hoc. Na comparação de glicose entre os grupos foi utilizado uma análise não paramétrica, Kruskal-Wallis, uma vez que o pressuposto de homogeneidade das variâncias não foi atingido após a aplicação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Bioestat de licença livre.

5 RESULTADOS

5.1 Indução e Recuperação de anestesia

Após a análise dos dados pode-se verificar que a concentração de 10mg/L falhou em 65,7% das vezes em induzir os *C. bimaculatum* a o estágio V (anestesia profunda) no tempo estipulado de dez minutos. Ou seja, essa concentração não permitiu que os espécimes de acara preto atingissem o estágio mais indicado para praticas invasivas, o que por si só indica que esta concentração não é efetiva nem interessante ao manejo. Porém, esta mostra-se segura para outras práticas, visto que ainda assim ela provocou a maioria dos estágios esperados no que se espera para o transporte, no entanto, concentrações mais baixas que 10mg/L podem ser mais indicadas nesses casos. Em alguns espécimes pode-se notar a reação a estímulos quando na concentração de 10mg/L, já outros não apresentaram perda do equilíbrio.

As concentrações de 20mg/L e 30mg/L induziram os acaras a anestesia profunda, podendo-se verificar de forma clara e bem definida a passagem por cada estágio de indução, chegando a anestesia profunda em um tempo médio de oito minutos aproximadamente. Notou-se que em um tempo de até cinco minutos em média 90% dos espécimes atingiram em sua maioria estágios de anestesia profunda, já apresentando perda do equilíbrio e batimentos operculares lentos.

O estágio de anestesia cirúrgica só foi alcançado pelas concentrações de 40mg/L e 50mg/L, tendo sido alcançado em um período anterior aos cinco minutos em média. Observou-se que os peixes apresentaram um tanto quanto diferente em comparação com as induções anteriores, apresentando espasmos e em alguns casos uma elevada produção de muco.

A indução e recuperação de anestesia do eugenol dos acaras pode ser observada na tabela 1, onde pode-se observar que o tempo de indução é diretamente proporcional ao aumento na concentração do anestésico, ou seja, o tempo decresce a medida que a concentração do anestésico aumenta ($P < 0,001$), seguindo uma curva exponencial negativa ($y = 9.4877 e^{-0.002 x}$, $R^2 = 0.529$). O tempo de recuperação, no entanto aumenta quanto maior a concentração do anestésico eugenol ($P < 0,001$), indicado por uma curva polinomial ($y = 4E-05x^2 - 0,0336x + 11,652$, $R^2 = 0.466$).

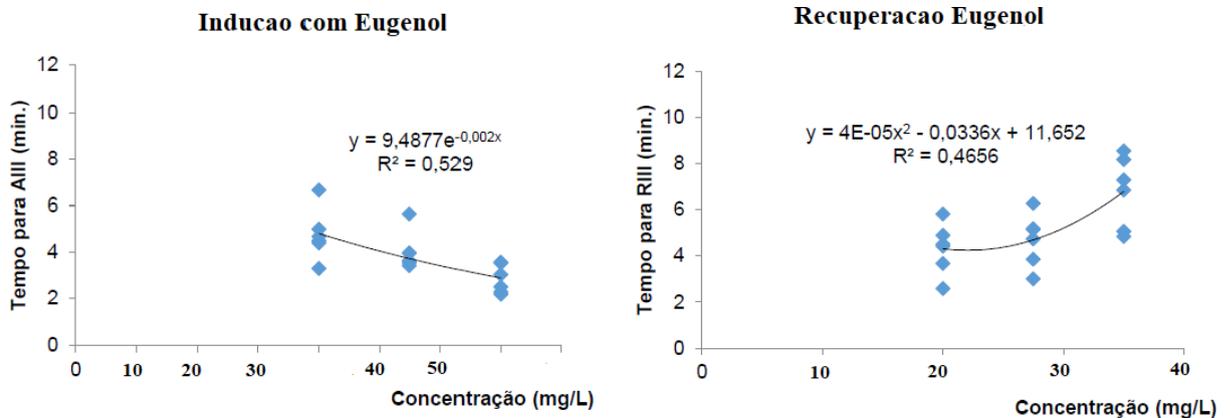
Tabela 1 - Tempo de indução (minutos) para a anestesia profunda e tempo de recuperação dos exemplares de acara preto, expostos a diferentes concentrações de eugenol. Os valores são apresentados em média \pm , n=5

Eugenol	10mg/L	20mg/L	30mg/L	40mg/L	50mg/L
Tempo médio para anestesia cirúrgica	8,74 \pm 1,05	7,47 \pm 0,54	6,04 \pm 0,28	5,17 \pm 0,17	4,07 \pm 0,12
Tempo médio de recuperação	2,37 \pm 1,54	3,23 \pm 1,22	3,89 \pm 1,04	4,34 \pm 1,32	5,33 \pm 0,97

Fonte: Elaborado pelo autor.

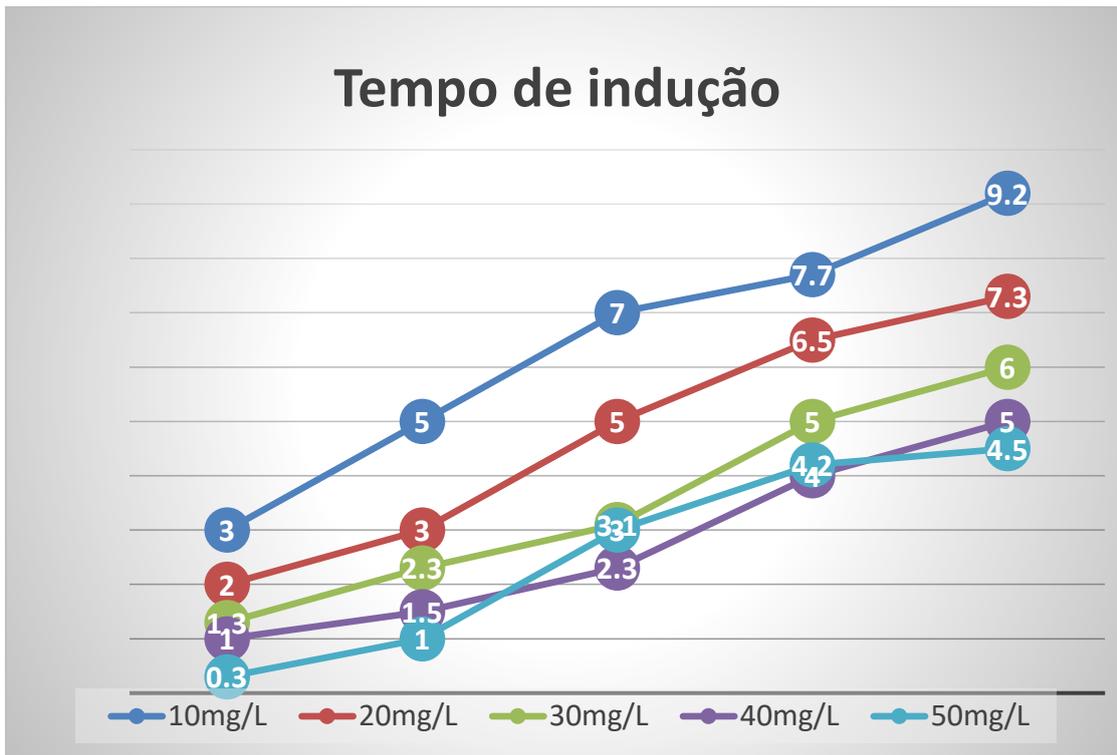
As concentrações de 20mg/L e 30mg/L mostraram-se seguras para os espécimes, sendo que estas demonstraram um índice menor de reações como espasmos ou produção excessiva de muco ao processo de indução e um período de recuperação moderadamente curto. Tendo estas concentrações causado perda de equilíbrio e ausência de respostas a estímulos externos. Houve parada dos movimentos das barbatanas porem os movimentos operculares foram ainda perceptíveis.

Figura 7 - Tempo de Indução e Recuperação pelo Eugenol



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Demonstrativo gráfico do Tempo de Indução



Fonte: Elaborado pelo autor.

O tempo de indução das concentrações de 40mg/L e 50mg/L, concentrações consideradas elevadas para os acaras, como visto na tabela, são considerados similares e ambos considerados aceitáveis apesar das reações adversas apresentadas. Os espasmos apresentados por alguns espécimes e a elevada produção de muco não foram considerados fatores adversos ou de impedimento na eficácia do anestésico visto sua ocorrência deu-se em casos isolados apenas.

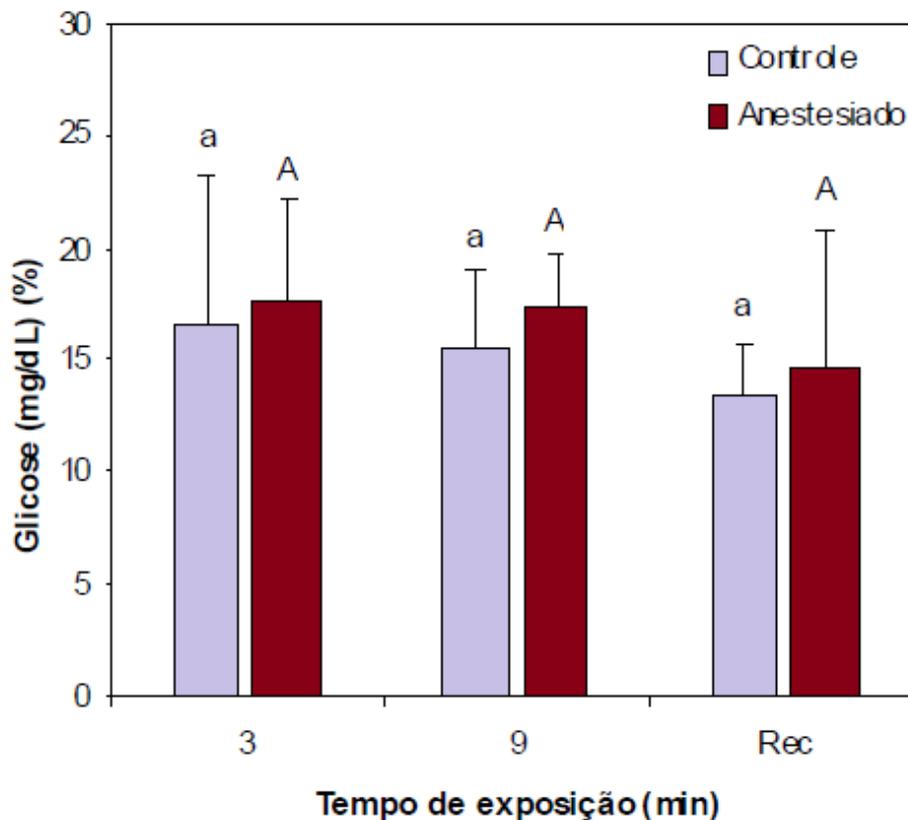
A ação do óleo de cravo parece ser mais eficiente quando em medias concentrações, alcançando o estágio de anestesia profunda em um período de tempo mais curto. Por outro lado, o tempo de recuperação variou entre 6.37 e 8.18 minutos para as diferentes concentrações de óleo de cravo, ao passo que para as baixas concentrações esse tempo foi menor, variando entre 3.77 e 6.78 minutos.

As concentrações de 40 mg/L e 50 mg/L de óleo de cravo utilizadas durante a biometria mostraram-se eficazes, uma vez que induziram a anestesia profunda (atingindo o estágio de anestesia profunda em 3 minutos e recuperando em 10 minutos) nos acaras preto os mesmos não exibiram qualquer reação quando manipulados.

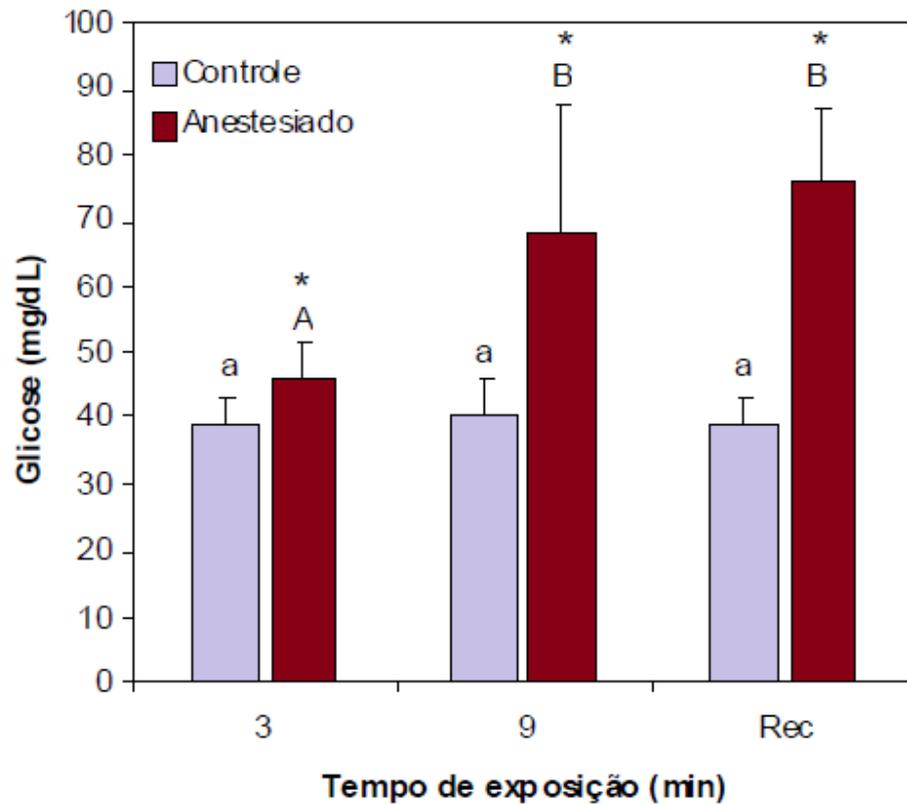
5.2 Efeitos fisiológicos da eugenol

As amostras de sangue foram extraídas através de punção caudal totalizando cerca de sessenta amostras, uma para cada espécime anestesiado mais dez para cada espécime do grupo controle e a glicose foi aferida utilizando-se o medidor de glicemia *accu-chek active*. Na análise dos valores da glicose verificou-se uma grande variabilidade dentro dos diferentes grupos de concentrações utilizados. Sendo assim, os valores foram analisados através de um teste não paramétrico (teste mediana) onde não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Contudo, o valor médio da glicose no grupo de controle foi de 40 mg/mL.

Figura 9 – Análise do grupo controle e a glicose



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Análise do grupo controle e a glicose

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 10 observa-se as concentrações de glicose plasmática em Acara-preto após a exposição por diferentes tempos a três tratamentos com eugenol Rec = 10 minutos de anestesia +recuperação. * indica diferença significativa do respectivo controle em cada tempo de exposição. Letras minúsculas indicam diferença significativa do tratamento-controle nos diferentes tempos de exposição por análise de variância e teste Kolmogorov-Smirnov's ($P < 0.05$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa do tratamento anestesiado nos diferentes tempos de exposição por análise de variância e teste Kolmogorov-Smirnov's ($P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o eugenol é eficaz como anestésico para o acara preto. Nas concentrações mais recomendadas, o anestésico induz a anestesia cirúrgica em um intervalo de tempo considerado seguro que seria por volta dos 5 minutos com recuperação na faixa dos 3 minutos o que também é aceitável. Os peixes progrediram em sequência pelos estágios típicos do processo de anestesia e recuperação como descrito por Zahl et al. (1999). A eficácia deste anestésico nas rotinas usuais da aquicultura vem sendo estudada para diferentes espécies tanto de peixes quanto crustáceos estes com boa resposta ao anestésico (IWAMA et al., 1989; TSANTILLAS et al., 2006). Com estes estudos pode-se observar que as concentrações de anestésico e sua eficácia é afetada diretamente pela temperatura, pelo peso do peixe mostrando que os efeitos variam mesmo dentro da mesma espécie, o que demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados para assim determinar qual a concentração indicada no caso de novas espécies.

As pesquisas com óleo de cravo onde este é usado como anestésico (MYLONAS et al., 2005; WEBER et al., 2006; GHANAWI et al., 2015), pode-se verificar que em relação a outros anestésicos as concentrações de eugenol utilizadas são sempre em média 10 vezes menor, indicando o quanto o eugenol é eficaz ou mesmo que este apresenta um mecanismo de ação mais apropriado e menos agressivo. Segundo Zahl et al. (2014), o mecanismo de ação exato do eugenol em peixes ainda não foi estudado com mais profundidade. O fato do eugenol afetar diferentes receptores pode vir a explicar sua eficácia mesmo em pequenas doses se comparado com outras substâncias anestésicas.

A efetividade dos anestésicos em peixes vem sendo alvo de vários estudos nos últimos anos buscando formas de maximizar seus efeitos e prover assim um melhor bem-estar animal em práticas como o manejo e mesmo na reprodução assistida. Porém, a eficácia dos anestésicos é afetada por fatores externos e internos como a biologia da espécie ou fatores ambientais como temperatura (IVERSEN et al., 2003; COYLE; DURBOROW; TIDWELL, 2004; NEIFFER; STAMPER, 2009). Desta forma é importante estudos que determinem a dose exata e mais eficaz de cada uma das substâncias anestésicas disponíveis atualmente.

O tempo máximo indicado para a indução anestésica em peixes é em média 10 minutos, fato observado visto que substâncias ou concentrações que excedam este período de tempo podem vir a resultar em lesões aos espécimes anestesiados, seja pela baixa oxigenação e danos neurológicos, seja pelo acúmulo da substância em seu organismo. Segundo Ross e Ross (2008), o anestésico ideal para peixes deve induzir anestesia em até cinco minutos,

apresentando perda do equilíbrio e tônus muscular para assim o manuseio do espécime seja mais fácil. No entanto o anestésico deve proporcionar um tempo de recuperação de até três minutos, sendo essa considerada uma recuperação rápida, o que é ideal nesses casos, deve deixar baixos resíduos nos tecidos, não apresentar riscos para os utilizadores, assim como ter um baixo custo e uma fácil aquisição e disponibilidade no mercado (WEBER et al., 2009; SEREZLI et al., 2012). Neste estudo perda total do equilíbrio e tônus muscular foi observado com concentrações proporcionais a usadas em espécies semelhantes como a tilápia do Nilo.

Na pesquisa desenvolvida as concentrações de 40mg/L e 50mg/L atuaram dentro do tempo máximo aceitável, uma vez que anestesia profunda dos acaras foi atingida em menos de 10 minutos. Contudo as concentrações de 10mg/L e 20mg/L demonstraram menos efeitos adversos e uma transição mais sutil entre as etapas o que indica estas concentrações para o transporte. Seguindo este critério as concentrações mais baixas produzem um efeito de letargia nos acaras o que por sua vez geraria uma menor taxa de estresse em um eventual transporte, contudo a prolongada exposição ao anestésico, mesmo em baixas concentrações, deve ser estudada e seus efeitos observados no médio e longo prazo.

A indução de anestesia, o tempo de recuperação e as concentrações dos anestésicos (óleo de cravo) necessários para atingir os diferentes estágios, em acara preto, exibiram algumas similaridades e disparidades em relação a outras espécies de peixes induzidas com o mesmo anestésico. Para o eugenol, a indução de anestesia resultou numa relação exponencial negativa entre a concentração e o tempo de indução, ao passo que o tempo de recuperação seguiu uma função polinomial onde as concentrações mais altas resultam no aumento do tempo de recuperação.

Este padrão de variação foi idêntico ao descrito para algumas espécies de peixes marinhos, como o esturjão-beluga *Huso huso* e a corvina, *Argyrosomus regius* (TSANTILAS et al., 2006; SEREZLI et al., 2012; SHALUEI et al., 2012). No entanto para outras espécies como o tilápia nilótica (*Oreochromes niloticus*) foi observada uma resposta oposta, onde as doses mais elevadas de eugenol resultaram em períodos de recuperação mais curtos (WEBER et al., 2009). Diferentes espécies de peixes requerem diferentes concentrações de anestésicos para atingir a anestesia profunda em menos de 10 minutos. Para o Pacu foram utilizados 700 mg/L de fenoxietanol (193.35 ± 11.26 g a $19 \pm 1^\circ\text{C}$; SHALUEI et al., 2012), ao passo que para outras espécies foram necessárias concentrações mais baixas, nomeadamente 0.3 mL/L (300 mg/L) para juvenis de corvina (1.3 ± 0.03 g a 25°C ; SEREZLI et al., 2012). Estas pesquisas indicam que a resposta biológica relativamente a um anestésico é espécie-dependente, além do peso dos peixes e dos fatores ambientais previamente descritos por Weber et al. (2009).

O eugenol foi eficaz com concentrações 10 vezes menor do que o observado em outros anestésicos. Esta é uma das maiores vantagens observadas no óleo de cravo, uma vez que isso o torna mais barato para a aquicultura e minimiza a contaminação ao meio ambiente visto que o eugenol trata-se de um composto vegetal, o que por sua vez espera-se que venha a garantir sua decomposição de forma mais rápida em relação a substâncias sintéticas (SOTO; BURHANUDDIN, 1995; MYLONAS et al., 2005).

Nesta pesquisa, o tempo de indução para o óleo de cravinho decresce com o aumento das doses de anestésico, seguindo uma curva exponencial. Anteriormente, um padrão similar já tinha sido descrito para espécies tropicais (WEBER et al., 2009), onde foram observadas diferenças significativas no tempo de indução com o óleo de cravinho, mas não se encontraram diferenças significativas no tempo de recuperação. Não existe literatura disponível sobre a eficácia das doses de óleo de cravo que devem ser administradas no manejo de acara preto. Para várias espécies de peixes ósseos a dose eficaz de óleo de cravo para atingir a anestesia profunda pode variar entre 20 e 150 mg/L (MYLONAS et al., 2005).

Os procedimentos cirúrgicos como pequenas incisões para remoção de tumores, implantação de dispositivos de telemetria, marcações e práticas de recolha de sangue, que envolvem o uso de agulhas e outros instrumentos cirúrgicos bem como os procedimentos de reprodução assistida como a hipofiseção, requerem e recomenda-se que o peixe esteja anestesiado profundamente por forma a evitar lesões no peixe e no próprio operador.

Embora existam benefícios no uso de anestesia durante as rotinas práticas em aquicultura, os anestésicos também podem causar respostas negativas de stress (IWAMA et al., 1989; ORTUÑO; ESTEBAN; MESEGUER, 2002; ROSS; ROSS, 2008). Para procedimentos de rotina, a sedação (sem perda de equilíbrio) (i.e. 100 mg/L de eugenol de acordo com Shaluei et al., (2012) ressaltando-se que os valores e concentrações mudam de acordo com a espécie, é mais aconselhada do que a anestesia profunda, sendo utilizadas doses menores de anestésico, poupando o ambiente e os custos. Os espécimes de acara preto apresentaram sinais de estresse quando submetidos a dosagens mais altas que as estudadas, comportamento errático e irrequieto bem como movimentos bruscos, quando são expostos a grandes doses de anestesia, comparado com as situações em que não se usa anestesia, sugerindo um aparente efeito de stress ao próprio anestésico.

7 CONCLUSÕES

A partir desta pesquisa pode concluir-se que o eugenol pode ser usado como anestésico em acara preto. As concentrações mais adequadas para atingir a anestesia profunda à temperatura de 28°C são de 40 mg/L para o eugenol sendo que as concentrações 10 mg/L e 20mg/L para o óleo de cravo mostraram-se mais indicadas atividades de manejo. Estas concentrações são também aceitáveis para a espécie *Cichlasoma bimaculatum*.

A concentração adequada de anestésico para a sedação deve reduzir a atividade do peixe, facilitando os procedimentos de manuseamento e permitir a rápida recuperação, acelerando assim os procedimentos de rotina. Assim, para induzir a sedação de acara preto durante um transporte (60-120 minutos) ou para procedimentos de triagem podem ser utilizados 10 mg/L ou 20mg/L de eugenol.

Todos os parâmetros testados levaram em consideração condições ambientais normais sendo a temperatura ambiente e da água na qual encontravam-se os espécimes na faixa de 27 a 30 graus Celsius.

REFERÊNCIAS

- ACERETE, L. et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 167-178, Aug. 2004.
- AKBULUT, B. et al. Effect of Anaesthesia with Clove Oil and Benzocaine on Feed Intake in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). **Turk. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 12, p. 667-673, 2012.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. 2000 report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 218, n. 5, p. 669-696, Mar. 2001.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, p. 199-235, 2007.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integr Comp Biol.**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BURKA, J. F. et al. Drugs in saumonid aquaculture. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 333-349, Oct. 1997.
- CÁRDENAS, S. Crianza de la corvina (*Argyrosomus regius*). **Cuadernos de Acuicultura**, FOESA, CSIC y MARM, Madrid, n. 3, 2010.
- CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytother Res**, v. 21, p. 501-506, 2007.
- CHATZIFOTIS, S. et al. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. **Aquaculture**, n. 307, p. 65-70, 2010.
- CHATZIFOTIS, S.; PANAGIOTIDOU, M.; DIVANACH, P. Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquac. Int.**, n. 20, p. 91-98, 2012.
- CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 537-546, June 2000.
- COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1/4, p. 509-529, Sept. 2007.
- COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. Anesthetics in Aquaculture. **Southern Regional Aquaculture**, n. 3900, 2009.

DUNCAN, N. et al. Acclimation to captivity and GnRH α -induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). **Cybium**, v. 32, p. 332-333, 2008.

DUNCAN, N. et al. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. In: ALLAN, G.; BURNELL, G. (Ed.). **Advances in aquaculture 36 hatchery technology**. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, 2013. (Technology and Nutrition, n. 242).

ELLIS, T. et al. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiol Biochem**, n. 38, p. 163-188, 2012.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v35n1/v35n1a10.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

FEDERATION OF EUROPEAN AQUACULTURE PRODUCERS (FEAP). **European Aquaculture production report 2005-2014**. FEAP Secretariat, 2015. Disponível em: <<http://www.feap.info/>>. Acesso em: 10 set. 2017.

FILICCIOTTO, F. et al. Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effects on some haematological parameters in farmed european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 494-502, 2012.

FISHBASE, Googlesearchs. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/Cichlasoma-bimaculatum.html>>. Acessado em 11 de julho de 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4th ed. Rockville, 2011. 468 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 23-34, July 2000.

GABRIEL, U. U.; AKINROTIMI, O. A. Management of Stress in Fish for Sustainable Aquaculture Development. **Researcher**, v. 3, p. 28-38, 2011.

GERWICK, L.; DEMERS, N. E.; BAYNE, C. J. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative and Physiology**, New York, v. 124, n. 3, p. 329-334, Nov. 1999.

GHANAWI, J.; MONZER, S.; SAOUD, I. P. Anaesthetic efficacy of clove oil, benzocaine, 2-phenoxyethanol and tricaine methanesulfonate in juvenile marbled spinefoot (*Siganus rivulatus*). **Aquaculture Research**, v. 44, p. 359-366, 2013.

GREEN, C. J. **Animal anaesthesia**. London: Laboratory Animal, 1979. v. 8. 300 p.

HANAWA, M. et al. Effects of cyanide exposure on *Dascyllus aruanus*, a tropical marine fish species: lethality, anaesthesia and physiological effects. **Aquarium Sciences and Conservation**, London, v. 2, n. 1, p. 21-34, Mar. 1998.

HEAVNER, J. E. Animal models and methods in anaesthesia research. In: GAY, W. I. (Ed.). **Methods in animal experimentation**. New York: Academic Press, 1981. v. 6, p. 115-130.

HER MAJESTY'S STATIONERY OFFICE. **Code of practice for the humane killing of animals under schedule 1 to the animals (Scientific procedures) Act 1986**. London, 1997. p. 3.

HILL, J. V.; DAVISON, W.; FORSTER, M. E. The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heart ventricle, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 1/2, p. 19-28, Sept. 2002.

HOLLOWAY, A. C. et al. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, Sept. 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p.1136-1142, Apr. 2004.

HOWE, G. E.; BILLS, T. D.; MARKING, L. L. Removal of benzocaine from water by filtration with activated carbon. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 32-35, 1999.

HUNTINGFORD, F. A. et al. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 332-372, 2006.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

IWAMA, G. K.; ACKERMAN, P. A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. v. 3. p. 1-15.

IWAMA, G. K. et al. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Can J Zool**, n. 67, p. 2065-2073, 2009.

KEENE, J. I. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 89-101, Feb. 1998.

KIESSLING, A. et al. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, ms-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aortacannulated atlantic salmon (*salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3/4, p. 301-308, Jan. 2009.

KING, W. V. et al. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquac Res**, v. 36, p. 1442-1449, 2005.

KULLANDER, S. O. Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, **Stockholm**, 431 p., 2000.

KREIBERG, H. Stress and Anesthesia. In: OSTRANDER, G. K. (Ed). The Laboratory Fish. Baltimore: Academic Press, 2000. p. 503-509.

LAWRENCE, A. B. What is Animal Welfare? In: BRANSON, E. (Ed.). Fish Welfare. Fish Veterinary Society. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 7-16.

MOLINERO, A.; GONZALEZ, J. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Spraus aurata* L.) during confinement. **Comp Biochem Physiol**, v. 111, p. 405-414, 2000.

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

MYLONAS, C. C. et al. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

MEYER, C. C. et al. Reproduction of hatchery produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. **Aquaculture**, n. 414/415, p. 309-317, 2013.

NEIFFER, D.; STAMPER, M. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. **ILAR Journal**, v. 50, p. 343-360, 2009.

ÖĞRETMEN, F.; GÖKÇEK, K. Comparative Efficacy of Three Anesthetic Agents on Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Turk. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 13, p. 51-56, 2013.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 89, p. 29-36, 2002.

PERDIKARIS, C. et al. Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). **Acta Vet. Brno**, v. 79, p. 481-490, 2010.

POLI, B. M. et al. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. **Aquaculture International**, v. 11, p. 301-311, 2003.

POTTINGER, T. G. The Stress Response in Fish – Mechanisms, Effects and Measurement. In: BRANSON, E. (Ed). Fish Welfare. Fish Veterinary Society. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 32-48.

READMAN, G. D. et al. Do Fish Perceive Anaesthetics as Aversive? **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-7, 2013.

RIBEIRO, L. et al. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 447, p. 116-128, 2015.

RIBEIRO, L. et al. Portuguese Research Studies Meagre Production in Earthen Ponds. **Global Aquaculture Advocate**, v. 16, p. 38-40, 2013.

ROTTA, J. et al. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. **Aquaculture**, v. 302, p. 82-88, 2010.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.

SEREZLI, R. et al. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). **J Appl Ichthyol**, v. 28, p. 87-90, 2012.

SHALUEI, F. et al. Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. **Fish Physiol Biochem**, v. 38, p. 1627-1634, 2012.

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

SOARES, F. et al. Pathologies affecting farmed meagre (*Argyrosomus regius*) at Ipimar's Research Center – Southern Portugal. In: **AQUA 2012: Global aquaculture securing our future**. Praga: European Aquaculture Society, 2012. p. 1043.

SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight for rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, p.149-152, 1995.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L. S. Anaesthesia, Surgery and related techniques. In: SCHERELK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.) **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1990. p. 213-272.

TSANTILAS, H. et al. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C.. **Aquaculture**, v. 253, p. 64-70, 2006.

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

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D.; ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-donilo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

ZAHL, I. H., O. SAMUELSEN, AND A. KIESSLING, 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 201-218.

WEBER, R. A. et al. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and second stress response in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 321, p. 108-112, 2011.

WEBER, R. A. et al. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 288, p.147-150, 2009.

WAGNER, O.; KAISER, H.; HECHT, T. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. **Aquaculture Research**, v. 27, p. 757-764, 1996.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, p. 52-59, 2009.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 201-218, 2012.