

ANDRÉ LUIZ VICENTE



**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E DE COMPOSTOS SINTÉTICOS  
COMO AGENTES ANESTÉSICOS PARA O LAMBARI *Astyanax  
altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias. Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky.

CURITIBA

2014

ANDRÉ LUIZ VICENTE

**Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre com a Comissão formada pelos professores:

---

Dr. Fabiano Montiani Ferreira  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Antonio Ostrensky  
Presidente/Orientador

---

Prof. Dr. Ricardo Guilherme D’Otaviano de Castro Vilani  
Membro

---

Prof. PhD. Hilton Amaral Júnior  
Membro

DEZEMBRO DE 2014

*Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Antonio Ostrensky pela orientação, confiança, paciência, dedicação, amizade, compreensão e por mais uma vez ter me proporcionado mais uma grande oportunidade, desta vez de realizar esta dissertação. A Dra. Ana Silvia Pedrazzani pela co-orientação, por todo empenho, dedicação, amizade e carinho com que conduziu os trabalhos desta dissertação, sem vocês dois isso nunca teria sido possível, nunca! Muito obrigado (Ad aeternum)!*

Dedicado ao meu pai João Vicente (*In memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Irene F. Vicente por ser minha grande inspiração e a razão principal de continuar acreditando e não ter desistido.

A Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFPR em especial, Maria José B. Maeda e ao coordenador Prof. Fabiano M. Ferreira.

Aos Professores, Ricardo G. Vilani, Hilton Amaral Jr., João R. Dittrich, Alex Maiorka, Henrique S. Koehler, Paulo Rossi, Ubiratan Silva, Luís F. Fávaro, José M. R. Aranha, Bernardo Baldiserotto e Mauro Cunha e ainda Luciane T. Gressler.

Ao pessoal do GIA pelo apoio e auxílio das mais diversas formas, em especial, Thayzi Zeni, Aline Horodesky, Diego Junqueira, Rafael Garcia-Madrigo, Diogo Hungria, Francis Mara Pinto, Gisela Castilho-Westphal, Debora Pestana, Cristiane Ivankiu e ainda... Alexandre Becker, Marcus Giroto, Karin Escobar, Leandro Pereira, Manuela Dreyer, Gabriel Wandembuk, Rafael Cabreira, Diogo Hungria, Lineu de Brito, Adriano Hauer, Bruno Miyawaki, Francesco Magnani e Pedro Istchuk.

Vinícius Moreira, Vitor Rossi, Wladimir Polese e Jeane Euriques por toda ajuda e dedicação durante os experimentos.

Ao grande mestre Robson V. de Souza pelo exemplo e inspiração. André, Fabiano, Alex, Fernando, Vicente, Zero e todos os amigos do (CEDAP/EPAGRI).

Ao alto comando da 2004\*\*, Juliano S. da Rocha, Diego R. W. Gomes, Fábio L. de Paula Valle e ainda Ivânio J. M. Bueno, André Luis S. Silva, André N. Mayer, Giuliano Tallys, João P. de Carvalho, Chayane da Rocha, Carolina Zanatta, Paula Leal, Rafael Chen, Régis Meurer, Bianca P. N. Bonatto e Simone Zgoda.

Ao pessoal do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia-UFPR, em especial, Marcelo França, Aldo Slaviero, Rui Ramos, Hair Ferrarini e Cleusa Brito.

Minhas segundas famílias e grandes irmãos de Santa Catarina, em especial Áurea, Iolando e Daniel Henriques, Fábio e Carlos Görresen, Aristides Rudnick e Fernando Camacho (Joinville). Marco Moriguti, Mônica, Vítor, Andrey Diniz e todo AH's crew (Florianópolis).

*“Toda vez que você estiver prestes a desistir, pense em todas as pessoas  
que adorariam ver você fracassar”*

Autor desconhecido

## APRESENTAÇÃO

Gradativamente, o uso de anestésicos vem tornando-se uma prática cada vez mais frequente em atividades que exigem a manipulação de peixes em procedimentos de rotina, tanto em laboratórios de pesquisa como em unidades de cultivo em escala comercial. Diversos produtos, naturais ou sintéticos, têm sido utilizados para este fim. O presente trabalho aborda o uso dos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora e dos compostos sintéticos MS-222 e propofol como anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae*, uma espécie de importância ambiental, comercial e que, mais recentemente, começa a ser empregada também em ensaios laboratoriais para os mais diversos fins.

O estudo foi focado na avaliação das características anestésicas de cada produto e na determinação das concentrações mais recomendadas, para uso em indivíduos de diferentes classes de tamanho. Para isso, ensaios laboratoriais foram realizados e baseados, principalmente, nos tempos de indução e de recuperação anestésicas.

A dissertação resultante, está estruturada na forma de dois artigos científicos e um artigo de divulgação científica: O capítulo 1, denominado “Efeito anestésico dos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora para o lambari *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)”; o capítulo 2, intitulado “Efeito anestésico do MS-222 (tricaína metanosulfonato) e do propofol (2,6-diisopropilfenol) no lambari *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)”; e o capítulo 3, “Uso de anestésicos no manejo de lambaris *Astyanax altiparanae* em laboratório”, que engloba os dois primeiros e apresenta os resultados para um público potencialmente leigo, mas que pode se interessar pelo tema.

O resultado final deste estudo, seguramente poderá ser aplicado em diversas situações em que haja uma preocupação com o grau de bem estar de peixes manipulados ou manejados em procedimentos de rotina em laboratório.

## USE OF ESSENTIAL OILS AND SYNTHETIC COMPOUNDS AS ANAESTHETICS FOR TETRA *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the anaesthetic effect of the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*), mint (*Mentha arvensis*) and camphor (*Cinnamomum camphora*), and of the synthetic compounds MS-222 and propofol, and to determine their optimal concentrations for use in the management of tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) in laboratory conditions. The fish were classified according to their length into classes I (individuals between 1.5 and 5.0 cm), II (between 5.1 and 8.0 cm) and III (greater than 8.1 cm). Initially, pilot studies were conducted to identify the concentration of anaesthetic required to promote five possible anaesthetic stages (I - sedation, II - mild anaesthesia, III - deep anaesthesia, IV - surgical anaesthesia, V - medullary collapse). The necessary concentrations required to promote stage IV anaesthetic induction were defined, and the animals of each size class were subjected to five different concentrations of the anesthetics (n = 10 fish/concentration in each test). After 15 minutes of exposure to the anaesthetic, the fish were transferred to clean water to evaluate the anaesthetic recovery time. Additionally, the glucose level was measured in the fish of classes II and III that were subjected to concentrations previously defined as optimal for each of the tested anaesthetics (n = 10 fish/treatment). Optimal concentrations of the clove, mint and camphor oils for surgical anaesthesia of *A. altiparanae* were 35, 50 and 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectively, for size class I; 35, 130 and 600  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectively, for class II; and 35, 140, and 600  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectively, for class III. MS-222 optimal concentration was 90  $\text{mg L}^{-1}$  for the three size classes and propofol 0,22, 0,23, and 0,27  $\text{mg L}^{-1}$ , for classes I, II and III, respectively.

**Keywords:** fish, anaesthetic induction, management, sedation

# USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E DE COMPOSTOS SINTÉTICOS COMO AGENTES ANESTÉSICOS PARA O LAMBARI *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000)

## RESUMO

O uso de peixes em atividades de pesquisa em laboratórios tem se intensificado nas últimas décadas e o lambari *Astyanax* sp., tem sido uma das espécies frequentemente utilizadas como bioindicador e como modelo em ensaios laboratoriais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito anestésico dos óleos essenciais de cravo *S. aromaticum*, menta *M. arvensis* e cânfora *C. camphora* e dos compostos sintéticos MS-222 (Tricaína metanosulfonato) e propofol e estabelecer as concentrações ideais de cada um desses produtos para anestesia de lambaris *A. altiparanae* de três diferentes classes de tamanho durante o manejo em laboratório. Inicialmente foram realizados testes pilotos para se avaliar as concentrações de anestésicos suficientes para promoção dos cinco possíveis estágios anestésicos (I – sedação, II – anestesia leve, III – anestesia profunda, IV – anestesia cirúrgica, V – colapso medular). Posteriormente, os animais foram submetidos a cinco diferentes concentrações de cada um dos anestésicos, todas testadas em dez animais por concentração. Após 15 minutos de exposição aos anestésicos os peixes foram transferidos para água sem anestésico, para avaliação do tempo da recuperação anestésica. A mortalidade e o comportamento alimentar foram observados durante as 48 horas após a exposição aos anestésicos. O nível glicêmico de peixes das classes II e III submetidos às concentrações definidas previamente como ideais para cada um dos anestésicos testados (n=10 peixes/tratamento) foi adicionalmente avaliado. Todos os compostos avaliados proporcionam efeito anestésico em *A. altiparanae*. As concentrações ideais dos óleos de cravo, menta e cânfora para indução de anestesia cirúrgica para a classe I foram de 35, 50 e 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Para a classe II, 35, 130 e de 600  $\mu\text{L L}^{-1}$  e para a classe III 35, 140 e de 600  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Já para os compostos sintéticos, a concentração ideal de MS-222 foi de 90  $\text{mg L}^{-1}$  para as três classes de tamanho e as concentrações ideais de propofol foram de 0,22, 0,23 e de 0,27  $\text{mg L}^{-1}$  para as classes I, II e III respectivamente.

**Palavras chave:** espécie-modelo, indução anestésica, laboratório, manejo

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO E O PESO DAS CLASSES DE TAMANHO I, II E III DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO (A), MENTA (B) E CÂNFORA (C). ..... 29
- FIGURA 2. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* DA CLASSE DE TAMANHO I (INDIVÍDUOS ENTRE 1,5 E 5,0 CM) SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA. LETRAS DISTINTAS INDICAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ÓLEO. .... 30
- FIGURA 3. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* DA CLASSE DE TAMANHO II (INDIVÍDUOS ENTRE 5,1 E 8,0 CM) SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA. LETRAS DISTINTAS INDICAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ÓLEO. .... 31
- FIGURA 4. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* DA CLASSE DE TAMANHO III (INDIVÍDUOS ACIMA DE 8,1 CM) SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA. LETRAS DISTINTAS INDICAM AS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ÓLEO. .... 31
- FIGURA 5. TEMPOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA AO ESTÁGIO CIRÚRGICO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA (DIREITA) EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO E AO PESO DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* SUBMETIDOS AO MS-222 (SUPERIOR) E AO PROPOFOL (INFERIOR). .... 55
- FIGURA 6. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE *ASTYANAX ALTIPARANAE* DA CLASSE DE TAMANHO I (INDIVÍDUOS ENTRE 1,5 E 5,0 CM) SUBMETIDOS AO MS-222 E AO PROPOFOL QUE ATINGIRAM O ESTÁGIO DE ANESTESIA CIRÚRGICA. LETRAS DISTINTAS INDICAM DIFERENÇA

ESTATÍSTICA QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ANESTÉSICO. ....	56
FIGURA 7. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DA CLASSE DE TAMANHO II (INDIVÍDUOS ENTRE 5,1 E 8,0 CM) SUBMETIDOS AO MS-222 E AO PROPOFOL QUE ATINGIRAM O ESTÁGIO DE ANESTESIA CIRÚRGICA. LETRAS DISTINTAS INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ANESTÉSICO. ....	56
FIGURA 8. TEMPOS DE INDUÇÃO (ESQUERDA) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS (DIREITA) DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DA CLASSE DE TAMANHO III (INDIVÍDUOS ACIMA DE 8,1 CM) SUBMETIDOS AO MS-222 E AO PROPOFOL QUE ATINGIRAM O ESTÁGIO DE ANESTESIA CIRÚRGICA. LETRAS DISTINTAS INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA QUANDO COMPARADOS OS TEMPOS DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO PARA AS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DE UM MESMO ANESTÉSICO. ....	57
FIGURA 9. BIOMETRIA DO LAMBARI DO RABO AMARELO <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> : (A) MENSURAÇÃO; (B) PESAGEM. FOTOS: ANTONIO OSTRENSKY (A); THAYZI ZENI (B).....	77
FIGURA 10. ESTÁGIOS ANESTÉSICOS EM EXEMPLARES DE <i>A. ALTIPARANAE</i> : (A) PERDA DE REAÇÃO A ESTÍMULOS EXTERNOS; (B) PERDA PARCIAL DE EQUILÍBRIO; (C) PERDA TOTAL DE EQUILÍBRIO; (D) REDUÇÃO DE BATIMENTOS OPERCULARES. NOTA: OPÉRCULOS FECHADOS (SETA). FOTOS: ANTONIO OSTRENSKY.....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRINCIPAIS COMPONENTES E DENSIDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CÂNFORA, CRAVO E MENTA. ....	20
TABELA 2. ESTÁGIOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E COMPORTAMENTOS CARACTERÍSTICOS AVALIADOS PARA DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA, COMO ANESTÉSICOS PARA O LAMBARI <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> . ....	22
TABELA 3. CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS, AVALIADAS PARA EFEITO ANESTÉSICO PARA O LAMBARI <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DE DIFERENTES CLASSES DE TAMANHO. ....	22
TABELA 4. CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA ANESTESIA DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DA CLASSE DE TAMANHO I (INDIVÍDUOS ENTRE 1,5 A 5,0 CM) E O RESPECTIVO NÚMERO DE INDIVÍDUOS QUE ATINGIRAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS ANESTÉSICOS. ....	25
TABELA 5. CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA ANESTESIA DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DA CLASSE DE TAMANHO II (INDIVÍDUOS ENTRE 5,1 A 8,0 CM) E O RESPECTIVO NÚMERO DE INDIVÍDUOS QUE ATINGIRAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS ANESTÉSICOS. ....	26
TABELA 6. CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA ANESTESIA DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DA CLASSE DE TAMANHO III (INDIVÍDUOS ACIMA DE 8,1 CM) E O RESPECTIVO NÚMERO DE INDIVÍDUOS QUE ATINGIRAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS ANESTÉSICOS. ....	27
TABELA 7. NÍVEIS GLICÊMICOS SANGUÍNEOS (MEDIANAS $\pm$ 50%) DE LAMBARIS <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DE SEXOS E CLASSES DE TAMANHO DISTINTOS, ANESTESIADOS COM OS ÓLEOS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA, ALÉM DOS TRATAMENTOS CONTROLE E BRANCO. ....	32
TABELA 8. CONCENTRAÇÕES RECOMENDADAS E TEMPOS ESPERADOS (MEDIANAS $\pm$ 50%) DE INDUÇÃO E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS DE <i>ASTYANAX ALTIPARANAE</i> DAS CLASSES DE TAMANHO I, II E III SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA. ....	33

TABELA 9. TEMPO DE INDUÇÃO (ESTÁGIO CIRÚRGICO) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES UTILIZANDO DIFERENTES ÓLEOS ESSENCIAIS. ....	35
TABELA 10. ESTÁGIOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E COMPORTAMENTOS CARACTERÍSTICOS AVALIADOS PARA DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DO MS-222 E DO PROPOFOL, COMO ANESTÉSICOS PARA O LAMBARI <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E. 50	50
TABELA 11. CONCENTRAÇÕES DE MS-222 E PROPOFOL, AVALIADAS PARA EFEITO ANESTÉSICO PARA O LAMBARI <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E DE DIFERENTES CLASSES DE TAMANHO. ....	50
TABELA 12. CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA EFEITO ANESTÉSICO DE EXEMPLARES DE <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E DA CLASSE DE TAMANHO I (INDIVÍDUOS ENTRE 1,5 A 5,0 CM), II (5,1 A 8,0 CM) E III (ACIMA DE 8,1 CM) E O RESPECTIVO NÚMERO DE INDIVÍDUOS QUE ATINGIRAM OS DIFERENTES ESTÁGIOS ANESTÉSICOS. ....	53
TABELA 13. CONCENTRAÇÕES IDEAIS E TEMPOS (S) ESPERADOS (MEDIANAS $\pm$ 50%) DE INDUÇÃO E RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS DAS CLASSES DE TAMANHO I, II E III DE <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E SUBMETIDOS AO MS-222 E PROPOFOL. ....	57
TABELA 14. NÍVEIS GLICÊMICOS MÉDIOS DE LAMBARIS <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E DE SEXOS E CLASSES DE TAMANHO DISTINTOS (II – ANIMAIS ENTRE 5,1 E 8,0 CM; E III – ANIMAIS MAIORES QUE 8 CM), ANESTESIADOS COM AS CONCENTRAÇÕES DE MS-222 E DE PROPOFOL, DEFINIDAS COMO IDEAIS PARA CADA CLASSE.....	58
TABELA 15. TEMPO DE INDUÇÃO (ESTÁGIO CIRÚRGICO) E DE RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES UTILIZANDO DIFERENTES COMPOSTOS SINTÉTICOS. ....	60
TABELA 16. ESTÁGIOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA EM PEIXES. ....	78
TABELA 17. CONCENTRAÇÕES IDEAIS E TEMPOS (S) ESPERADOS (MEDIANAS $\pm$ 50%) DE INDUÇÃO E RECUPERAÇÃO ANESTÉSICAS DAS CLASSES DE TAMANHO I, II E III DE <i>ASTYANAX ALTIPARANA</i> E SUBMETIDOS AOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA E AOS ANESTÉSICOS SINTÉTICOS MS-222 E PROPOFOL. ....	80

## SUMÁRIO

Capítulo 1. Efeito anestésico dos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora para o lambari <i>Astyanax altiparanae</i> (Pisces, Characiformes).....	16
RESUMO .....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
1.2.1 Origem e manutenção dos peixes.....	19
1.2.2 Biometria.....	19
1.2.3 Sistema de observação.....	19
1.2.4 Anestésicos utilizados .....	20
1.2.5 Determinação das concentrações de anestésicos utilizadas ....	21
1.2.6 Efeito anestésico dos óleos essenciais.....	22
1.2.7 Colheita de sangue e análise dos níveis glicêmicos .....	24
1.2.8 Análise estatística .....	24
1.3 RESULTADOS .....	25
1.3.1 Relação entre as concentrações testadas e os efeitos anestésicos obtidos .....	25
1.3.2 Efeito do peso dos animais no tempo de anestesia até o estágio IV e no tempo de recuperação anestésica.....	27
1.3.3 Indução ao estágio de anestesia cirúrgica (Estágio IV) e posterior recuperação anestésica.....	30
1.3.4 Níveis glicêmicos.....	31
1.3.5 Concentrações ideais.....	32
1.4 DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS .....	37
Capítulo 2. Efeito anestésico do MS-222 (tricaína metanosulfonato) e do propofol (2,6-diisopropilfenol) no lambari <i>Astyanax altiparanae</i> (Teleostei, Characidae).....	44

2.1 INTRODUÇÃO.....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.2.1 Origem e manutenção dos peixes.....	47
2.2.2 Biometria.....	48
2.2.3 Sistema de observação.....	48
2.2.4 Determinação das concentrações anestésicas efetivas.....	49
2.2.5 Colheita de sangue e análise dos níveis glicêmicos .....	51
2.2.6 Análise estatística .....	52
2.3 RESULTADOS .....	52
2.3.1 Concentrações x estágios anestésicos atingidos.....	52
2.3.2 Influência do peso individual sobre o tempo de indução e de recuperação anestésica.....	53
2.3.3 Concentrações ideais de cada anestésico.....	55
2.3.4 Níveis glicêmicos.....	58
2.4 DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS .....	63
Capítulo 3. Uso de anestésicos no manejo de lambaris <i>Astyanax altiparanae</i> em laboratório.....	76

## **CAPÍTULO 1. EFEITO ANESTÉSICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO, MENTA E CÂNFORA PARA O LAMBARI *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIFORMES)**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anestésico dos óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum*), menta (*Mentha arvensis*) e cânfora (*Cinnamomum camphora*) e determinar suas concentrações ideais para o uso em atividades de manejo de lambaris, *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), em laboratório. Os peixes foram classificados, de acordo com seu comprimento, nas classes I (indivíduos entre 1,5 e 5,0 cm), II (entre 5,1 e 8,0 cm) e III (maiores que 8,1 cm). Inicialmente foram realizados testes pilotos para se identificar as concentrações de anestésicos necessárias para promoção dos cinco possíveis estágios anestésicos (I – sedação, II – anestesia leve, III – anestesia profunda, IV – anestesia cirúrgica, V – colapso medular). Definidos os limites de concentração necessários para promover a indução anestésica ao estágio IV, os animais de cada uma das classes de tamanho foram submetidos a diferentes concentrações de cada um dos três óleos essenciais (n=10 peixes/concentração em cada teste). Após 15 minutos de exposição aos anestésicos, os peixes foram transferidos para água sem anestésico para avaliação do tempo de recuperação anestésica. Adicionalmente, foi aferido o nível glicêmico de peixes das classes II e III submetidos às concentrações definidas previamente como ideais para cada um dos anestésicos testados (n=10 peixes/ tratamento). As concentrações ideais para anestesia cirúrgica de *A. altiparanae* da classe de tamanho I dos óleos de cravo, menta e cânfora foram de 35, 50 e de 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Para a classe II, 35, 130 e de 600  $\mu\text{L L}^{-1}$  e para a classe III 35, 140 e de 600  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** peixes, indução anestésica, manejo, sedação

## 1.1 INTRODUÇÃO

O lambari *Astyanax altiparanae* é considerado uma espécie de peixe de elevada rusticidade, produtividade e de fácil manejo em condições de cultivo (Garutti (2003); Silva *et al.*, 2011). Além disso, o lambari vem sendo utilizado como um importante bioindicador de contaminação de corpos hídricos (Winkaler *et al.*, 2001; Alberto *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2009), e também como modelo em ensaios laboratoriais (Akaishi *et al.*, 2004; Goldoni e Silva, 2012; Santos *et al.*, 2013).

Vários autores enfatizam que o uso de peixes como modelo em pesquisas realizadas em laboratório tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Law, 2003; Sneddon, 2012a; Smith, 2014). Sabe-se, contudo, que procedimentos de rotina em laboratório, como a manipulação dos animais para identificação sexual, biometria, indução hormonal para reprodução, colheita de sangue e tecidos para análises clínicas, dentre outros, têm grande influência sobre a condição física e sobre o bem-estar dos peixes (Roubach e Gomes, 2001; Rocha *et al.*, 2012). Bem estar que é um tema cada vez mais frequente nas discussões sobre o uso de animais em pesquisas científicas (Backus *et al.*, 2014; Carbone, 2014; Smith, 2014). Nesse contexto, a anestesia pode ser uma importante ferramenta no manejo, minimizando os efeitos do estresse e evitando injúrias físicas aos animais utilizados (Ross e Ross, 2008).

Diversos produtos naturais têm sido testados como anestésicos, dentre eles os óleos essenciais derivados de plantas. Tais produtos caracterizam-se como uma alternativa viável aos anestésicos sintéticos utilizados em peixes, pois são geralmente de baixo custo e fácil obtenção (Vidal *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstraram a eficácia anestésica do óleo essencial de cravo, *Eugenia caryphollata*, em espécies como a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Cotter e Rodnick, 2006), o jundiá *Rhamdia quelen* (Cunha e Rosa, 2006), a tilápia *Oreochromis niloticus* (Deriggi *et al.*, 2006), o pirarucu *Arapaima gigas* (Honczaryk e Inoue, 2009), a piraputanga *Brycon*

*hilarii* (Fabiani *et al.*, 2013), e o próprio lambari *A. altiparanae* (Pereira-Da-Silva *et al.*, 2009; Maximino *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014).

O óleo de menta *Mentha sp.* já foi testado na promoção de anestesia de espécies como o pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Gonçalves *et al.*, 2008), o dourado *Salminus brasiliensis* (Pádua *et al.*, 2010) e o robalo peva *Centropomus parallelus* (Souza *et al.*, 2012). Recentemente, Pedrazzani e Ostrensky (2014), avaliaram o efeito anestésico do óleo de menta e também do óleo de cânfora *Cinammomum camphora* para peixes-palhaço *Amphiprion ocellaris*. Entretanto, trabalhos específicos que investiguem a eficácia do óleo de cânfora como promotor anestésico em animais aquáticos ainda são bastante raros.

A glicemia (concentração de glicose plasmática) é um dos parâmetros fisiológicos mais frequentemente utilizados como indicador de estresse em espécies de peixes de interesse comercial cultivados no Brasil, como o pacu-caranha *P. mesopotamicus* (Abreu *et al.*, 2012), a matrinxã *Brycon amazonicus* (Hoshiba *et al.*, 2009), o curimatá *Prochilodus lineatus* (Gonçalves *et al.*, 2010), a tilápia do Nilo *O. niloticus* (Martins *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012) e o tambaqui *Colossoma macropomum* (Chagas *et al.*, 2012). Segundo Morgan e Iwama (1997), a glicemia desempenha importante papel na disponibilização de energia para o metabolismo animal em situações desfavoráveis, por isso os índices glicêmicos tendem a aumentar na presença de fatores estressantes.

Este trabalho tem como objetivo investigar o uso dos óleos de cravo, menta e cânfora como anestésicos para lambaris *A. altiparanae* durante sua manipulação em laboratório, avaliando a influência do peso dos animais nesse processo, definindo as concentrações ideais de cada anestésico e os respectivos tempos de recuperação dos peixes submetidos a tais concentrações.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos

Ambientais (GIA), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba/PR.

### 1.2.1 Origem e manutenção dos peixes

Os peixes utilizados nos experimentos foram obtidos junto a uma empresa comercial sediada em Curitiba/PR. Após a recepção, os animais passaram por aclimatação gradual às condições laboratoriais de temperatura e de pH conforme descrito no item 1.2.3. A seguir, foram acondicionados em três tanques circulares contendo sistemas internos de filtragem biológica, preenchidos com 800L de água, mantidos sob aeração contínua. A temperatura foi controlada através do uso de termostato digital (Steck-TIC-17RGTi, Brasil) e mantida entre 24,0 e 26,0°C. Os animais foram alimentados, *ad libitum*, duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), com ração comercial contendo 45% de proteína bruta.

### 1.2.2 Biometria

Para classificação dos indivíduos segundo a sua classe de tamanho, os peixes foram pesados individualmente em balança digital de precisão de bancada (Shimadzu-AY220, Japão) e então foi realizada a mensuração de cada indivíduo (comprimento total) com paquímetro manual (Vonder-200mm/0,05mm, Brasil). A biometria foi realizada antes do início dos experimentos (para classificação dos indivíduos segundo seu tamanho) e também por ocasião do término da exposição aos anestésicos, ou seja, imediatamente antes da transferência dos animais para os recipientes de recuperação (para determinação do peso individual de cada indivíduo testado).

### 1.2.3 Sistema de observação

Previamente ao início dos ensaios, os peixes, já selecionados por classe de tamanho, eram coletados ao acaso dos tanques de manutenção e transferidos para os aquários de experimentação, onde eram mantidos por três

dias, antes do início dos experimentos. O sistema experimental era constituído por 24 aquários retangulares de vidro (30x30x40cm), preenchidos com 25L de água. Os aquários eram interligados por um sistema de recirculação de água e filtros biológicos e mecânicos, e mantidos sob aeração constante. Após o período de adaptação, os peixes eram então expostos aos tratamentos anestésicos.

Durante os experimentos, eram realizados o monitoramento e o controle diário dos seguintes parâmetros físico-químicos da água nos sistemas de recirculação: pH ( $6,99 \pm 0,41$ ) (média  $\pm$  desvio padrão), através de peagâmetro digital (AZ-86505, China); temperatura ( $25,3^{\circ}\text{C} \pm 1,69$ ), oxigênio dissolvido ( $6,18 \pm 0,77$  mg/L) e percentual de saturação de oxigênio ( $75,46 \pm 8,48$ ), por meio de oxímetro digital (YSI 550A, EUA); concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido na água ( $1,73 \pm 0,72$  mg/L), mensurada por titulometria com hidróxido de sódio 0,02N (Apha., 2005a) e concentração de nitrogênio na forma de amônia total ( $0,16 \pm 0,4$  mg/L), obtida pelo método do indofenol (Apha., 2005b), seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA).

#### 1.2.4 Anestésicos utilizados

A composição química dos óleos essenciais de cânfora, cravo e menta foi disponibilizada pela empresa fornecedora (Ferquima Indústria e Comércio LTDA), através de laudo técnico específico (Tabela 1).

Tabela 1. Principais componentes e densidades dos óleos essenciais de cânfora, cravo e menta.

Óleo essencial	Principais componentes (%)	Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
Cânfora	Limoneno = 30; 1,8-cineol = 35,5; Alfa-pineno = 13; Para-cimeno = 10.	0,88
Cravo	Eugenol = 85; Beta Cariofileno = 13; Alfa Copaeno + metil eugenol = 0,16.	1,04
Menta	Limoneno = 6.75; Cineol = 0.34; Mentona = 20.25; Isomentona = 7.48; Mentil acetato = 4.60;	0,90

Óleo essencial	Principais componentes (%)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
	Isopulegona = 1.81; L-mentol = 37; Pulegona = 1.39; Carvona = 0.08.	

Fonte: Ferquima Indústria e Comércio LTDA<sup>TM</sup>.

As soluções-estoque dos óleos essenciais foram obtidas através da sua diluição em álcool etílico absoluto na proporção de 1:10 (Vidal *et al.*, 2008; Bernardes Júnior *et al.*, 2013). Estas soluções foram mantidas em frascos âmbar, estocados em ambiente arejado.

### 1.2.5 Determinação das concentrações de anestésicos utilizadas

A definição das concentrações anestésicas dos óleos essenciais testados em *A. altiparanae* foi feita em duas etapas. Inicialmente, foi realizado um experimento piloto, no qual foi definida a concentração inicial mínima a ser utilizada de cada um dos anestésicos, seguindo metodologia proposta por Pedrazzani e Ostrensky (2014). Para isso, um peixe era colocado em um recipiente de vidro contendo o respectivo anestésico na concentração desejada conforme descrito na Tabela 3. Após quinze minutos de exposição, o peixe era avaliado quanto às prováveis alterações comportamentais características de cada estágio anestésico (Tabela 2). Em conformidade com a resposta obtida, uma nova e mais elevada concentração era preparada e um novo peixe exposto individualmente ao respectivo anestésico. Esse procedimento era repetido sucessivamente até que as dosagens utilizadas fossem suficientes para promoção de todos os cinco níveis anestésicos descritos. A concentração posterior a maior utilizada em cada um dos tratamentos caracteriza dosagem letal. Dessa forma, os experimentos pilotos foram realizados utilizando o número mínimo necessário de animais para definição das faixas de concentrações efetivas de cada anestésico. Foram consideradas seguras as concentrações que induziram a maioria dos animais ao estágio anestésico IV, porém sem causar a morte do indivíduo.

Tabela 2. Estágios de indução anestésica e comportamentos característicos avaliados para determinação da eficácia dos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora, como anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae*.

Estágio anestésico	Parâmetros comportamentais
I – Sedação	Perda de reação ao toque e a estímulos visuais.
II – Anestesia leve	Início de perda de equilíbrio, caracterizado pelo movimento natatório na posição normal intercalado por movimentação irregular (lateral).
III – Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio, natação descoordenada.
IV – Anestesia cirúrgica	Mínimo movimento opercular, ausência de movimentos natatórios.
V – Colapso medular	Ausência de batimentos operculares.

Fonte: Adaptado de (Ross e Ross, 2008).

### 1.2.6 Efeito anestésico dos óleos essenciais

Para realização dos experimentos definitivos, os animais foram separados em três diferentes categorias, de acordo com seu comprimento: classe I: peixes de 1,5 a 5,0 cm; classe II: peixes de 5,1 a 8,0 cm; classe III: peixes com comprimento acima de 8,0 cm. Cinco concentrações de cada anestésico, definidas a partir dos resultados obtidos nos experimentos pilotos, foram testadas para cada uma das classes de tamanho (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações de óleos essenciais, avaliadas para efeito anestésico para o lambari *Astyanax altiparanae* de diferentes classes de tamanho.

Composto ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Classe		
	I	II	III
<b>Cânfora</b>	275; 300; 325; 350; 375	500; 550; 600; 650; 700	500; 550; 600; 650; 700
<b>Cravo</b>	20; 25; 30; 35; 40	20; 25; 30; 35; 40	20; 25; 30; 35; 40
<b>Menta</b>	30; 35; 40; 45; 50	100; 110; 120; 130; 140	100; 110; 120; 130; 140
<b>Álcool</b>	375	700	700

\* Classes: I. Peixes de 1,5 a 5,0 cm, II. Peixes de 5,1 a 8,0 cm e III. Peixes acima de 8 cm.

As soluções-testes foram preparadas diluindo-se as soluções-estoques dos anestésicos em água proveniente dos próprios tanques onde eram mantidos os peixes. Os animais (n=10 peixes/concentração/anestésico) foram anestesiados em béqueres de 1 L, nos testes com peixes das classes I e II e em béqueres de 2 L, nos experimentos com peixes da classe III. Os animais eram imersos individualmente, durante quinze minutos, nas soluções-teste (fase de indução anestésica). Um outro grupo de 10 peixes foi submetido ao mesmo procedimento, porém, neste caso, a imersão foi feita em água sem o uso de qualquer anestésico (branco), pelo mesmo período. Por fim, um grupo complementar (controle) foi exposto à concentração máxima de álcool etílico utilizada na preparação das soluções-teste de óleos anestésicos, para avaliação dos efeitos do álcool sobre a sobrevivência e sobre o comportamento dos peixes.

Durante a fase de indução eram cronometrados e registrados os tempos necessários para que os peixes atingissem os estágios anestésicos desejados. Posteriormente, era realizada a identificação sexual dos animais, através do dimorfismo que ocorre em relação à aspereza presente na nadadeira anal dos machos e que não ocorre em relação às fêmeas (Andrade *et al.*, 1984; Navarro *et al.*, 2006). Em seguida, os peixes eram transferidos para béqueres contendo água isenta de anestésicos (fase de recuperação). Os animais eram considerados recuperados quando retornavam à posição vertical e passavam a nadar regularmente. O tempo necessário para recuperação foi cronometrado e registrado.

Um dos focos centrais deste estudo foi a análise da indução ao estágio de anestesia cirúrgica (estágio IV), pois é aquele estágio em que se consegue um grau anestésico máximo, com riscos mínimos à sobrevivência dos animais. Para se chegar à concentração considerada como ideal, foram arbitrados os seguintes critérios: a) a maioria dos indivíduos testados deveria atingir o estágio IV; b) não mais que 30% dos indivíduos testados poderia atingir o estágio anestésico V; c) a mortalidade máxima deveria ser inferior a 10% dos indivíduos testados.

Após as fases de indução e de recuperação anestésicas, os peixes foram monitorados por mais 48 horas, para avaliação de eventual mortalidade e registro de seu comportamento alimentar.

#### 1.2.7 Colheita de sangue e análise dos níveis glicêmicos

Peixes da classe II e da classe III foram submetidos individualmente às concentrações previamente definidas como ideais para cada um dos anestésicos testados ( $n=10/\text{classe}/\text{anestésico}$ ). Um grupo controle foi exposto à concentração máxima de álcool etílico utilizada no preparo das soluções-teste de óleos anestésicos ( $700 \mu\text{L L}^{-1}$ ), enquanto peixes do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento de manejo, porém sem a adição de qualquer substância exógena. O procedimento de indução anestésica foi semelhante ao descrito anteriormente. Ao final desse período, os peixes foram submetidos à venopunção na região caudal, com auxílio de seringas de 3 ml e agulhas de  $0,55 \times 20$  mm, para colheita de cerca de 0,05 ml de sangue. As taxas de glicemia foram analisadas por meio de um glicosímetro digital (FreeStyle Lite<sup>®</sup>, China) e tiras analíticas (OneTouch Select, EUA). Em seguida, os animais foram transferidos para um tanque de recuperação, onde foram mantidos em observação por 48 horas. Os peixes da classe I, por sua vez, não apresentavam volume sanguíneo suficiente para a obtenção de amostras para as análises e, por esse motivo, não foram analisados.

#### 1.2.8 Análise estatística

Foi realizada uma análise preliminar de normalidade dos dados obtidos, através do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não se ajustavam à curva normal de Gauss, os tempos de indução e recuperação anestésica dos diferentes compostos testados foram comparados estatisticamente através dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. Todos os testes foram efetuados com intervalo de confiança de 95% utilizando-se o *software* Statsoft Statistica<sup>MR</sup> versão 10.0 (StatSoft, EUA).

### 1.3 RESULTADOS

#### 1.3.1 Relação entre as concentrações testadas e os efeitos anestésicos obtidos

Quando avaliados os indivíduos da classe I, a menor concentração testada foi sempre suficiente para promover o estágio anestésico I em todos os peixes. O mesmo aconteceu em relação ao estágio anestésico II, com exceção da concentração de 275  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de cânfora, na qual apenas 7 dos 10 animais atingiram tal estágio. Além disso, foram identificadas concentrações que possibilitaram que parte ou que a totalidade dos organismos submetidos aos produtos testados atingissem os estágios anestésicos III e IV. Nos testes com o óleo de cânfora, alguns indivíduos atingiram o estágio anestésico V, ainda assim, nunca em proporção superior a 30% dos animais testados. Nenhum peixe morreu durante o experimento ou nas 48 horas posteriores ao período de recuperação (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações utilizadas para anestesia de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho I (indivíduos entre 1,5 a 5,0 cm) e o respectivo número de indivíduos que atingiram os diferentes estágios anestésicos.

ANESTÉSICOS	Concentrações $\mu\text{L L}^{-1}$	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Estágio V	Morte
CRAVO	20	10	10	0	0	0	0
	25	10	10	8	0	0	0
	30	10	10	10	4	0	0
	35	10	10	10	10	0	0
	40	10	10	10	10	0	0
MENTA	30	10	10	0	0	0	0
	35	10	10	4	0	0	0
	40	10	10	10	6	0	0
	45	10	10	10	6	0	0
	50	10	10	10	8	0	0
CÂNFORA	275	10	7	3	0	0	0
	300	10	10	10	8	1	0
	325	10	10	10	10	0	0
	350	10	10	10	10	1	0
	375	10	10	10	10	3	0

Nos tratamentos com menta e cânfora, foi necessária uma maior concentração de anestésico para se obter os efeitos desejados nos indivíduos da classe II que as utilizadas com peixes da classe I. Contudo, assim como aconteceu com indivíduos da classe I, todos os compostos testados foram eficientes para promover os estágios anestésicos I e II em *A. altiparanae*. Animais em estágio anestésico III também foram registrados em todos os tratamentos, exceto na menor concentração testada do óleo de cravo, onde nenhum dos indivíduos testados atingiu tal estágio. Apenas nos testes com o óleo de cravo, os peixes atingiram o estágio anestésico V em proporção superior a 30% (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações utilizadas para anestesia de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho II (indivíduos entre 5,1 a 8,0 cm) e o respectivo número de indivíduos que atingiram os diferentes estágios anestésicos.

ANESTÉSICOS	Concentrações $\mu\text{L L}^{-1}$	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Estágio V	Morte
CRAVO	20	10	10	0	0	0	0
	25	10	10	9	5	0	0
	30	10	10	10	8	1	0
	35	10	10	10	10	0	0
	40	10	10	10	10	7	0
MENTA	100	10	10	8	6	0	0
	110	10	10	7	4	0	0
	120	10	10	9	6	0	0
	130	10	10	10	9	0	0
	140	10	10	10	8	3	0
CÂNFORA	500	10	10	10	8	0	0
	550	10	10	10	7	0	0
	600	10	10	10	10	0	0
	650	10	10	10	10	0	0
	700	10	10	10	10	0	0

Todas as concentrações dos compostos testados foram eficientes para promover os estágios anestésicos I e II nos indivíduos da classe III de *A. altiparanae*. O óleo de cânfora foi o único anestésico em que os indivíduos atingiram o estágio IV em todas as concentrações testadas. Na maior concentração testada de óleo de cravo ( $40 \mu\text{L L}^{-1}$ ), 60% dos peixes atingiram o

estágio anestésico V. Este mesmo estágio foi observado nos testes com o óleo de cânfora em suas três maiores concentrações, porém em proporção nunca superior a 30%. Apenas dois peixes morreram durante o experimento (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações utilizadas para anestesia de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho III (indivíduos acima de 8,1 cm) e o respectivo número de indivíduos que atingiram os diferentes estágios anestésicos.

ANESTÉSICOS	Concentrações $\mu\text{L L}^{-1}$	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	Estágio V	Morte
CRAVO	20	10	10	4	0	0	0
	25	10	10	10	1	0	0
	30	10	10	10	8	0	0
	35	10	10	10	10	1	0
	40	10	10	10	10	6	1
MENTA	100	10	10	4	0	0	0
	110	10	10	3	0	0	0
	120	10	10	10	8	0	0
	130	10	10	10	9	0	0
	140	10	10	10	10	0	0
CÂNFORA	500	10	10	10	10	0	0
	550	10	10	10	8	0	0
	600	10	10	10	9	2	0
	650	10	10	10	10	3	1
	700	10	10	10	10	3	0

Não foram observadas alterações comportamentais nos tratamentos branco e controle e nenhum peixe, de nenhuma classe de tamanho, morreu durante as 48 horas posteriores ao período de recuperação nesses tratamentos.

### 1.3.2 Efeito do peso dos animais no tempo de anestesia até o estágio IV e no tempo de recuperação anestésica

Na Figura 1 estão representados os tempos de indução e de recuperação anestésica em função do peso dos peixes e das concentrações utilizadas. Nos tratamentos com o óleo de cravo observou-se que o peso dos animais praticamente não teve influência sobre o tempo de indução anestésica. Neste caso, o fator que mais influenciou, e de forma direta, foi a concentração

empregada deste anestésico. Ainda assim, os limites entre os menores e os maiores tempos de indução ocorreram em uma estreita faixa de concentrações (entre 24 e 36  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Já em relação ao tempo de recuperação, o efeito do peso só foi notado em relação às maiores concentrações. Neste caso, indivíduos maiores levaram mais tempo para se recuperar da anestesia.

O óleo de menta, por sua vez, apresentou resultados menos padronizados em relação a ambos os fatores estudados (peso e concentração), tanto na anestesia quanto na fase de recuperação. Até cerca de 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  os peixes demoraram até 600 segundos para atingir o estágio anestésico IV, independentemente do seu peso. A partir de concentrações maiores, o tempo de resposta caiu acentuadamente, chegando a 300 segundos para indivíduos menores, submetidos a concentração de 160  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O peso e o tamanho tiveram grande influência no tempo de recuperação, sendo que os indivíduos menores e mais leves demoraram muito mais tempo para se recuperarem (>700 segundos) que aqueles maiores e mais pesados.

Os peixes submetidos aos tratamentos com o óleo de cânfora apresentaram respostas mais previsíveis que os dos tratamentos com menta. Ainda assim, o tempo de indução foi menor para indivíduos com pesos entre 10 e 25 g que para peixes menores. Em relação ao tempo de recuperação, o efeito foi semelhante. Em elevadas concentrações, peixes menores apresentaram menores tempos de recuperação que os peixes maiores.

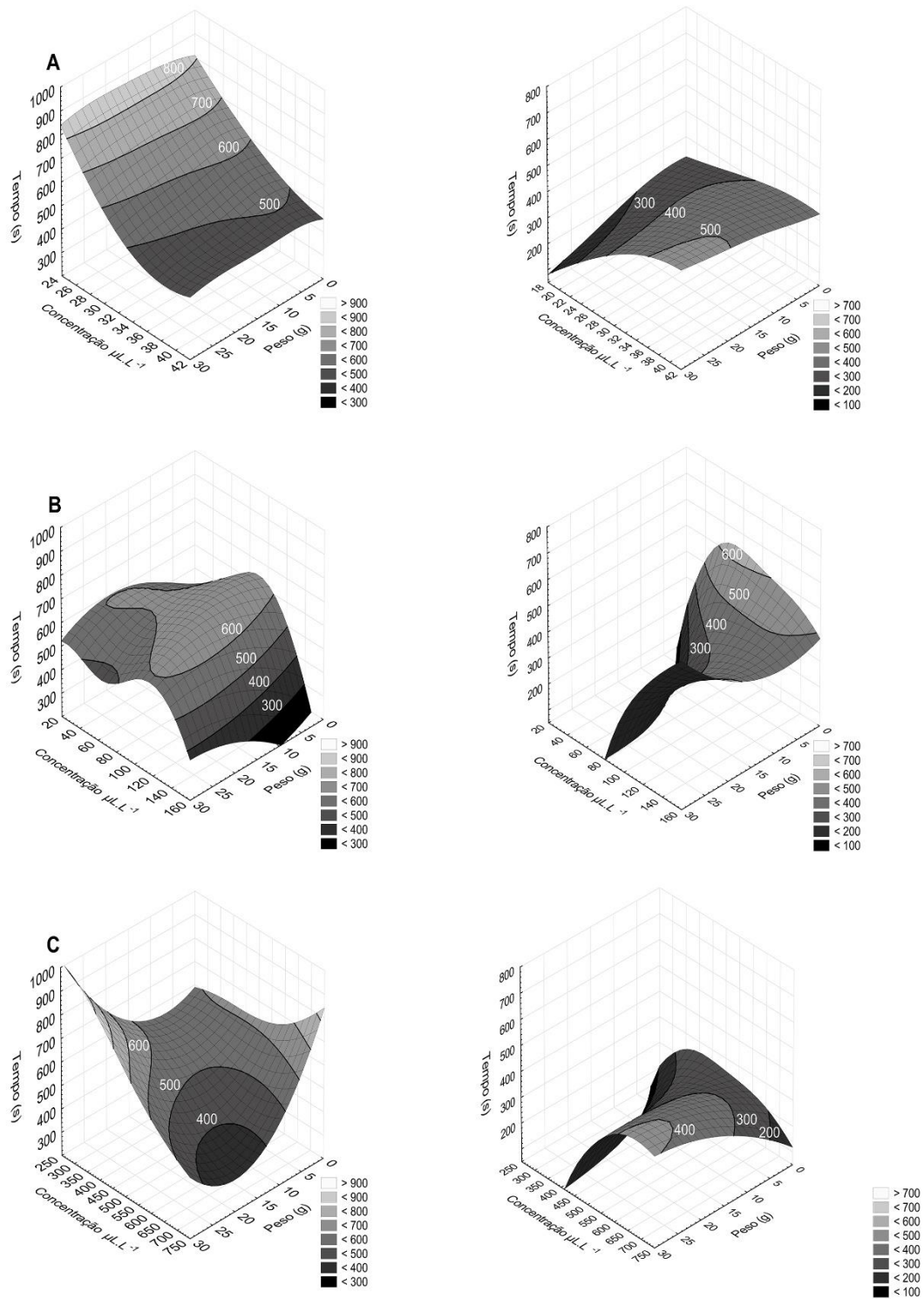


Figura 1. Tempos de indução (esquerda) e de recuperação anestésicas (direita) em relação à concentração e o peso das classes de tamanho I, II e III de *Astyanax altiparanae* submetidos aos óleos essenciais de cravo (A), menta (B) e cânfora (C).

### 1.3.3 Indução ao estágio de anestesia cirúrgica (Estágio IV) e posterior recuperação anestésica

A avaliação dos resultados apresentados pelos tratamentos em que os critérios preestabelecidos para a anestesia foram respeitados, foram realizados de forma comparativa. Não houve diferença significativa entre os tempos registrados para indução e recuperação anestésicas dos animais da classe de tamanho I em relação a nenhuma das concentrações testadas de óleo de cravo. Já em relação aos óleos de menta e de cânfora, nas concentrações 50 e 350  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, o tempo de recuperação foi maior que o observado nas outras concentrações testadas (Figura 2).

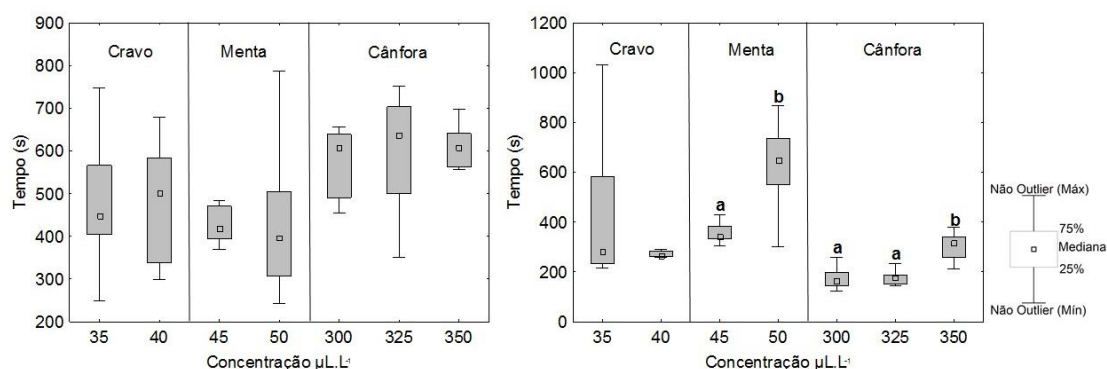


Figura 2. Tempos de indução (esquerda) e de recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho I (indivíduos entre 1,5 e 5,0 cm) submetidos aos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora. Letras distintas indicam as diferenças estatísticas quando comparados os tempos de indução e de recuperação nas diferentes concentrações testadas de um mesmo óleo.

Quando avaliados animais da classe II, apenas o tratamento com o óleo de menta apresentou diferença quanto aos períodos de indução anestésica ( $p < 0,05$ ). O óleo de menta, na concentração 120  $\mu\text{L L}^{-1}$ , e o óleo de cânfora, na concentração 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , proporcionaram períodos mais curtos de recuperação em relação às demais concentrações testadas (Figura 3).

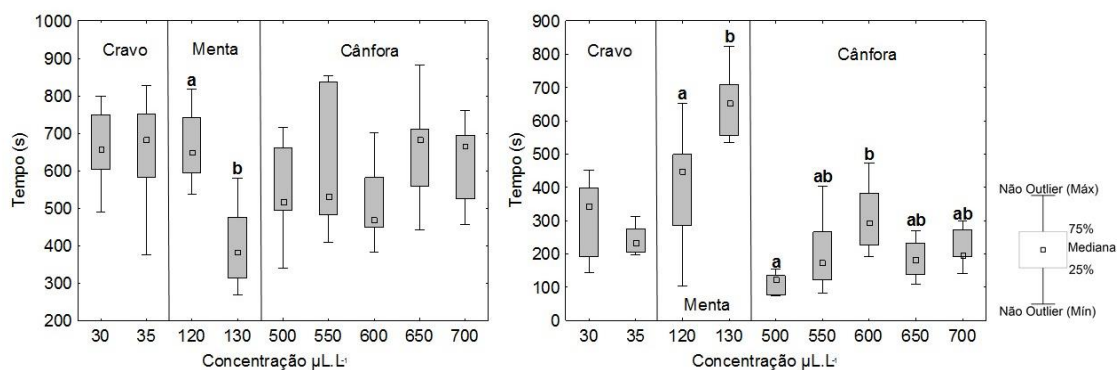


Figura 3. Tempos de indução (esquerda) e recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho II (indivíduos entre 5,1 e 8,0 cm) submetidos aos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora. Letras distintas indicam as diferenças estatísticas quando comparados os tempos de indução e de recuperação nas diferentes concentrações testadas de um mesmo óleo.

Em relação ao óleo de cravo, o tempo de indução na concentração 35  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi inferior ao registrado na concentração de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Não foram constatadas diferenças significativas entre os tempos para indução e recuperação anestésicas dos animais da classe de tamanho III submetidos às concentrações testadas de menta e cânfora (Figura 4).

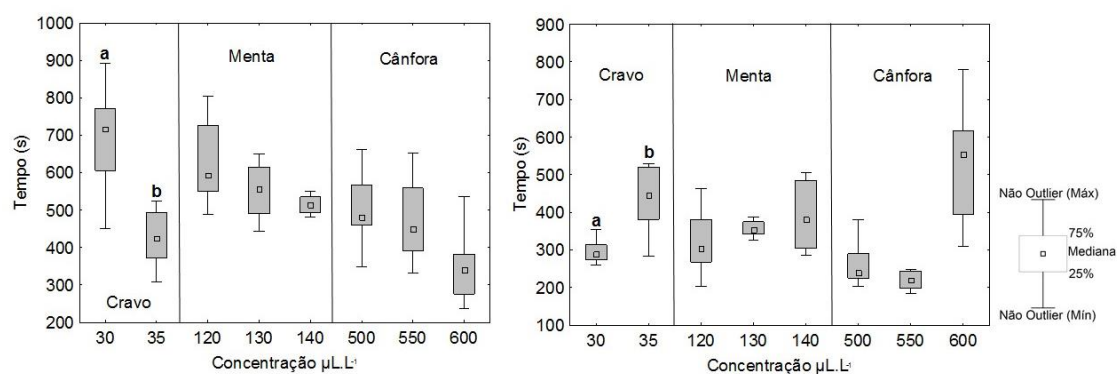


Figura 4. Tempos de indução (esquerda) e recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho III (indivíduos acima de 8,1 cm) submetidos aos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora. Letras distintas indicam as diferenças estatísticas quando comparados os tempos de indução e de recuperação nas diferentes concentrações testadas de um mesmo óleo.

### 1.3.4 Níveis glicêmicos

Diferenças significativas em relação aos níveis glicêmicos dos indivíduos das classes de tamanho II e III submetidos aos diferentes óleos essenciais só foram registradas no tratamento com o óleo de cânfora (Tabela 7). Não foi

observada diferença significativa entre os níveis glicêmicos de machos e fêmeas em nenhum dos tratamentos.

Tabela 7. Níveis glicêmicos sanguíneos (medianas  $\pm$  50%) de lambaris *Astyanax altiparanae* de sexos e classes de tamanho distintos, anestesiados com os óleos de cravo, menta e cânfora, além dos tratamentos controle e branco.

Anestésico	Parâmetro	Variável	(n)	Glicemia (mg/dL)	p
Cravo	Sexo	F	11	71 (47 – 81)	0,34
		M	9	54 (43 – 71)	
	Classe	II	10	65 (47 – 76)	0,85
		III	10	62 (43 – 80)	
Menta	Sexo	F	13	42 (37 – 56)	0,45
		M	7	56 (41 – 71)	
	Classe	II	10	41,5 (41 – 73)	0,67
		III	10	52,5 (27 – 60)	
Cânfora	Sexo	F	11	76 (54 – 92)	0,65
		M	9	65 (42 – 80)	
	Classe	II	10	85 (65 – 118) <sup>a</sup>	0,01
		III	10	52,5 (41 – 71) <sup>b</sup>	
Controle	Sexo	F	11	45 (38 – 63)	0,28
		M	9	65 (38 – 100)	
	Classe	II	10	63,5 (38 – 83)	0,36
		III	10	50,5 (27 – 61)	
Branco	Sexo	F	13	57 (36 – 54)	0,93
		M	7	53 (43 – 70)	
	Classe	II	10	57 (30 – 76)	0,96
		III	10	55 (47 – 67)	

### 1.3.5 Concentrações ideais

Com base nos resultados anteriores, foram definidas às concentrações recomendadas de cada anestésico para as diferentes classes de tamanho de *A. altiparanae*. Os tempos esperados para o alcance do estágio anestésico

cirúrgico e de recuperação em relação a cada uma das concentrações recomendadas são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações recomendadas e tempos esperados (medianas  $\pm$  50%) de indução e de recuperação anestésicas de *Astyanax altiparanae* das classes de tamanho I, II e III submetidos aos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora.

Anestésico	Classe de Tamanho	Concentração $\mu\text{L L}^{-1}$	Tempo esperado de indução (s)	Tempo esperado de recuperação (s)
Cravo	I (1,5 - 5 cm)	35	449,5 (404-566)	281 (234-583)
	II (5,1-8,0 cm)	35	683 (583-752)	234 (206-276)
	III (> 8,1 cm)	35	425 (373-494)	447 (381-520)
Menta	I (1,5 - 5 cm)	50	396 (306,5-504,5)	647 (550-737)
	II (5,1- 8,0 cm)	130	383 (313-475)	654 (556-708)
	III (> 8,1 cm)	140	515 (494-535)	380,5 (305-485)
Cânfora	I (1,5 - 5 cm)	300	608 (490,5-638,5)	166 (146-199)
	II (5,1- 8,0 cm)	600	471 (448-582)	293 (227-383)
	III (> 8,1 cm)	600	341,5 (275,5-383)	554 (395-616)

#### 1.4 DISCUSSÃO

A eficiência de um anestésico é geralmente definida em função do seu período de latência (diferença temporal entre o início de um evento e o momento em que seus efeitos tornam-se perceptíveis). Diversos pesquisadores sugerem que a indução anestésica de peixes deve preferencialmente ocorrer em um período de aproximadamente três minutos e que a recuperação seja igualmente rápida, preferencialmente em período inferior a cinco minutos (Marking e Meyer, 1985; Bell, 1987; Keene *et al.*, 1998; Roubach e Gomes, 2001; Ross e Ross, 2008). No presente caso, embora todos os compostos testados tenham apresentado efeitos anestésicos para *A. altiparanae*, tanto o tempo de indução quanto de recuperação anestésica foram relativamente maiores que o sugerido por estes pesquisadores.

No caso do óleo de cravo, a concentração efetiva desse anestésico teve pouca relação com o tamanho dos indivíduos. De acordo com Ross e Ross (2008) e Moreira *et al.* (2010), peixes da mesma espécie, mas de tamanhos diferentes, exigem tempos distintos para que atinjam o estágio desejado de anestesia cirúrgica e de recuperação. Summerfelt e Smith (1990) e Coyle *et al.* (2004), afirmaram que peixes maiores tendem a responder de forma mais positiva aos anestésicos. Já Roubach *et al.* (2005), postulam que peixes menores apresentam superfície branquial proporcionalmente maior que a de peixes grandes e por isso a indução anestésica tende a ocorrer mais rapidamente. Há também evidências de que peixes que apresentam reduzida massa corpórea, como os lambaris, podem apresentar maior resistência ao anestésico e também estar sujeitos à interferência de fatores inter e intraespecíficos, como formato do corpo e tamanho da superfície branquial, quantidade de gordura corpórea e variações na taxa metabólica como proposto por Burka *et al.* (1997). Independente do tamanho dos peixes, a concentração mais adequada de óleo de cravo foi a de 35  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Este valor é relativamente próximo aos sugeridos em diversos estudos realizados com outras espécies de peixes tropicais, que variaram de 36 a 48  $\mu\text{L L}^{-1}$ , para animais com peso variando de menos de 1 a até mais de 100 g (Tabela 9). Os resultados mostraram ainda uma adequada previsibilidade das respostas de *A. altiparanae* ao anestésico, tanto em relação ao período e a eficiência na indução quanto na recuperação.

As concentrações recomendadas para indução anestésica a partir do uso de óleo de menta foram distintas para animais de diferentes classes de tamanho, variando entre 383 e 515  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Esses valores são bastante superiores aos sugeridos por outros pesquisadores, que variaram de 55,5 a 166  $\mu\text{L L}^{-1}$ , para peixes de diferentes espécies e com peso variando de menos de 1 a até mais de 190 g (Tabela 9). Essa diferença pode estar relacionada às variações da composição química dos óleos utilizados, uma vez que a concentração de princípios ativos tende a variar de produto para produto. Uma das características importantes do óleo de menta é que ele apresentou uma grande margem de segurança quanto ao seu uso, pois não foi registrado uma única morte durante todos os ensaios.

A concentração de óleo de cânfora recomendada para *A. altiparanae* das classes de tamanho II e III corrobora com os dados de Pedrazzani e Ostrensky (2014), para o peixe-palhaço *A. ocellaris*. Nos dois estudos essa concentração foi a mesma, 600  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Esses pesquisadores também observaram uma característica peculiar apresentada pelos peixes semelhante à ocorrida com *A. altiparanae*. Em todos os tratamentos com o óleo de cânfora, nas três classes de tamanho, os peixes apresentaram intensa agitação pré-anestésica, provavelmente ocasionada pelo grande volume utilizado deste óleo e por sua volatilidade, perceptível pelo forte aroma exalado durante os ensaios.

Tabela 9. Tempo de indução (estágio cirúrgico) e de recuperação anestésica de diferentes espécies de peixes utilizando diferentes óleos essenciais.

Óleo de cravo						
Espécie	Peso (g)	Comprimento (cm)	[ ]	IV (s)	Recuperação	Autores
<i>Astyanax altiparanae</i>	0,6 ± 0,1	-	48 $\mu\text{L L}^{-1}$	209	337	(Pereira-Da-Silva <i>et al.</i> , 2009)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	110,5 ± 21,6	17,4 ± 1,4	48 $\mu\text{L L}^{-1}$	92	145	(Gonçalves <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rhamdia voulezii</i>	32,5	-	48 $\mu\text{L L}^{-1}$	230	74	Diemer <i>et al.</i> (2012)
<i>Centropomus paralelus</i>	28,5 ± 1,2	15,0 ± 0,7	36 $\mu\text{L L}^{-1}$	134	270	Souza <i>et al.</i> (2012)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	50	-	38,4 $\mu\text{L L}^{-1}$	106	160	(Rotili <i>et al.</i> , 2012)
<i>Brycon hilarii</i>	50,0 ± 20,8	16,3 ± 12,3	48 $\mu\text{L L}^{-1}$	306,3	342	(Fabiani <i>et al.</i> , 2013)
Óleo de menta						
<i>Colossoma macropomum</i>	88,7 ± 23,8	-	166 $\mu\text{L L}^{-1}$	110	136	Façanha e Gomes (2005)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	110,5 ± 21,6	17,4 ± 1,4	55,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	258,5	126	(Gonçalves <i>et al.</i> , 2008)
<i>Salminus brasiliensis</i>	194,1 ± 9,0	25,3 ± 0,9	133 $\mu\text{L L}^{-1}$	95	172	(Pádua <i>et al.</i> , 2010)
<i>Centropomus paralelus</i>	28,5 ± 1,2	15,0 ± 0,7	166 $\mu\text{L L}^{-1}$	120	181	Souza <i>et al.</i> (2012)
<i>Thoracocharax stellatus</i>	0,90 ± 0,28	3,80 ± 0,4	77,7 $\mu\text{L L}^{-1}$	271	232	(Lisboa <i>et al.</i> , 2014)

Óleo de cânfora						
<i>Amphiprion ocellaris.</i>	0,48 ± 0,21	2,59 ± 0,61	600 µL L <sup>-1</sup>	535	229	(Pedrazzani e Ostrensky, 2014)

Alterações nos parâmetros sanguíneos, incluindo as taxas de glicose plasmática, podem decorrer de fatores como a idade dos peixes, sexo, fatores genéticos, ambientais e nutricionais (Ranzani-Paiva e Godinho, 1988). O presente caso mostra também que não se pode descartar a hipótese de que tais alterações sejam também decorrentes do manejo pré-anestesia. Neste caso, como todos os animais foram expostos às mesmas condições de manejo, não foram registradas diferenças nas taxas glicêmicas a não ser quando comparadas as taxas quantificadas entre peixes das classes de tamanho II e III, submetidos ao óleo de cânfora. Moreira *et al.* (2011), trabalhando com juvenis de tilápia do Nilo *O. niloticus* anestesiados com óleo de cravo, também não encontraram alterações significativas na glicemia decorrentes do processo anestésico.

Contrapondo os resultados obtidos neste trabalho, alguns estudos identificaram aumento do nível de glicose sanguínea de animais submetidos a anestésicos com óleos essenciais, como é o caso de juvenis de salmão *Oncorhynchus tshawytscha* (Cho e Heath, 2000), expostos ao óleo de cravo e de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* (Sanchez *et al.*, 2014), submetidas a tratamentos com óleo de cravo e menta. Moreira *et al.* (2011) e Cosenza *et al.* (2014), sugerem que o aumento das taxas de glicose sanguínea indicam maior consumo de energia e, conseqüente, aumento no metabolismo dos peixes.

Dentre os anestésicos testados, o óleo de menta induziu os peixes da classe I e II ao estágio IV de anestesia mais rapidamente do que os outros óleos testados, porém os períodos de recuperação foram também maiores que os demais. Em procedimentos em que há necessidade de que o manejo dos peixes seja mais rápido, como em biometrias ou indução hormonal, a rápida indução anestésica é uma vantagem apresentada por esse óleo em relação aos óleos de cravo e cânfora. Porém, quanto mais rápida a indução, maior a probabilidade de se manter os peixes anestesiados por períodos muito

prolongados. Por isso, como relatado por Prince e Powell (2000), em ocasiões específicas, que envolvam procedimentos mais demorados ou invasivos, como é o caso da indução artificial à desova, pode ser não apenas positivo, mas também essencial que o peixe permaneça anestesiado por mais tempo.

Como todos os óleos essenciais avaliados neste trabalho proporcionaram efeitos anestésicos em lambaris *A. altiparanae*, a escolha sobre qual óleo deve ser utilizado dependerá do manejo a ser empregado e deverá considerar as características relacionadas aos períodos de indução e recuperação anestésicas proporcionado por cada óleo.

## REFERÊNCIAS

ABREU, J. S.; ESTEVES, F. R.; URBINATI, E. C. **Stress in pacu exposed to ammonia in water.** R. Bras. Zootec. 41: 1555-1560 p. 2012.

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.

ALBERTO, A. et al. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 247-255, 2005.

ANDRADE, D. R.; MENIN, E.; RIBEIRO, S. P. **Periodicidade da característica sexual secundária em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) Pisces, Characidae.** Revista Seiva. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 44: 9-12 p. 1984.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500-CO<sub>2</sub> C., v. 21, 2005a.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114., v. 21, 2005b.

BACKUS, B. L.; MCGLONE, J. J.; GUAY, K. Animal Welfare: Stress, Global Issues, and Perspectives. In: ALFEN, N. K. V. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems.** Oxford: Academic Press, 2014. p.387-402. ISBN 978-0-08-093139-5.

BELL, G. An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. **Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.** , p.16, 1987.

BURKA, J. F. et al. Drugs in salmonid aquaculture - A review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 333-349, 1997.

CARBONE, L. Chapter 11 - Euthanasia and Laboratory Animal Welfare. In: TURNER, K. B. V. (Ed.). **Laboratory Animal Welfare**. Boston: Academic Press, 2014. p.157-169. ISBN 978-0-12-385103-1.

CHAGAS, E. C. et al. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com b-glucano. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 221-227, 2012.

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS-222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546, 2000.

COSENZA, G. R. et al. Influence of glyceryl guaiacolate ether on anesthetics in tilapia compared to benzocaine and eugenol. **Revista MVZ Córdoba**, v. 19, p. 3944-3953, 2014. ISSN 0122-0268. Disponível em: <  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682014000100004&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682014000100004&nrm=iso) >.

COTTER, P. A.; RODNICK, K. J. Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 158-165, 2006.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, H. J. Anaesthetics in aquaculture. **SRAC Publication. No. 3900. Southern Regional Aquaculture Center, USA**, p. 6, 2004.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1504-1512, 2006.

CUNHA, M. A. D. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural, Santa Maria. RS**, v. 40, n. 10, p. 2107-2114, 2010. ISSN 0103-8478.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR**, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DIEMER, O. et al. Eugenol as anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR**, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

FABIANI, B. M. et al. Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brycon hilarii*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR.**, v. 35, n. 2, p. 113-117, 2013. ISSN 1807-8672.

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

FERREIRA, P. D. M. F. et al. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the world aquaculture society**, v. 45, n. 1, p. 28-34, 2014.

GARUTTI, V. **Piscicultura Ecológica**. São Paulo, SP: Fundação Editora da UNESP - FEU, 2003. p. 332.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. D. Potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal. Uberlândia, MG**, v. 28, n. 2, p. 297-301, 2012.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá, PR**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Transporte de juvenis de curimatá *Prochilodus lineatus* em diferentes densidades. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá, PR**, v. 32, n. 2, p. 205-211, 2010.

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural, Santa Maria, RS**, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009. ISSN 0103-8478.

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 445-452, 2009.

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

LAW, J. M. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. **Toxicol Pathol**, v. 31, p. 49-52, 2003.

LISBOA, B. D. C. et al. **Comparação da eficiência de dois anestésicos, mentol e eugenol, utilizados no peixe borboleta, *Thoracocharax stellatus* (Kner, 1858) (Characiformes: Gasteropelecidae).** XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES: p.1-3, 2014.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

MARTINS, M. L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221-228, 2010.

MOREIRA, A. G. L. et al. Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromatica* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR**, v. 32, n. 4, p. 419-423, 2010.

MOREIRA, A. G. L. et al. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 12, n. 3, p. 794-804, 2011. ISSN 1519 9940.

MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In Iwama, G.W.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (Eds.). . **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 247-270, 1997.

NAVARRO, R. D. et al. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. . **Zootecnia Tropical**, v. 24, n. 2, p. 165-176, 2006.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C. D.; SÁ, O. R. D. **Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG.** Revista Brasileira de Zootecias. Juiz de Fora, MG: Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. 11 (3): 237-232 p. 2009.

PÁDUA, S. B. et al. Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Bol. Inst. Pesca, São Paulo, SP**, v. 36, n. 2, p. 143-148, 2010.

PEDRAZZANI, A. S.; OSTRENSKY, A. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, v. 45, n. 8, p. 1-8, 2014. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/are.12535> >.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M. et al. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural, Santa Maria, RS**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009. ISSN 0103-8478.

PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage**, v. 20, n. 4, p. 1029-1032, 2000.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GODINHO, H. M. Características do plasma sanguíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições experimentais de criação. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 1988.

ROCHA, M. A. D. et al. Determinação da dose ótima de cloridrato de benzocaína na anestesia de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR**, v. 33, n. 6, p. 2403-2409, 2012.

ROSS, L. G.; ROSS, B. In: (Ed.). **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**: Blackwell Publishing Ltd., 2008. p.i-xv. ISBN 9781444302264.

ROTILI, D. A. et al. Uso de eugenol como anestésico em pacu. **Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, GO**, v. 42, n. 3, p. 288-294, 2012.

ROUBACH, R.; GOMES, L. **Uso de anestésicos durante o manejo de peixes.** Panorama da Aquicultura. Rio de Janeiro, RJ. 11: 37-40 p. 2001.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

SANCHEZ, M. S. D. S. et al. Respostas fisiológicas de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a anestésicos naturais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR**, v. 35, n. 2, p. 1061-1070, 2014.

SANTOS, L. P. D. et al. Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n. 48, 2013.

SILVA, L. D. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

SILVA, N. J. R. et al. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no estado de São Paulo, Brasil. **Informações Econômicas**, v. 41, n. 9, p. 17-28, 2011.

SILVA, R. B. D. et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. (Supl.1), p. 99-107, 2012.

SMITH, S. A. Chapter 17 - Welfare of laboratory fishes. In: TURNER, K. B. V. (Ed.). **Laboratory Animal Welfare**. Boston: Academic Press, 2014. p.301-311. ISBN 978-0-12-385103-1.

SNEDDON, L. U. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 1, p. 32-43, 1, 2012. ISSN 1557-5063. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506311002266>>.

SOUZA, R. A. R. D. et al. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo, SP**, v. 38, n. 3, p. 247-255, 2012.

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

VIDAL, L. V. O. et al. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biol. Sci. Maringá, PR**, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.

WINKALER, E. U. et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum, Maringá, PR**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

## **CAPÍTULO 2. EFEITO ANESTÉSICO DO MS-222 (TRICAÍNA METANOSULFONATO) E DO PROPOFOL (2,6-DIISOPROPILFENOL) NO LAMBARI *Astyanax altiparanae* (TELEOSTEI, CHARACIDAE)**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anestésico do MS-222 e do propofol e determinar suas concentrações ideais para manipulação segura de lambaris *Astyanax altiparanae* em laboratório. Os peixes foram divididos, segundo seu comprimento, em três classes: I (indivíduos entre 1,5 e 5,0 cm), II (entre 5,1 e 8,0 cm) e III (maiores que 8,1 cm). Inicialmente foram realizados testes pilotos para se avaliar as concentrações de anestésicos adequadas para promoção dos cinco possíveis estágios anestésicos (I – sedação, II – anestesia leve, III – anestesia profunda, IV – anestesia cirúrgica, V – colapso medular). Definidas as concentrações mínimas e máximas necessárias para se promover a anestesia no estágio IV, os animais foram expostos a cinco concentrações intermediárias (n=10 peixes/concentração) de cada um dos anestésicos, por 15 minutos. Foi ainda avaliado um grupo não exposto a anestésico (branco). Depois, os animais foram transferidos para água sem anestésico para avaliação do tempo necessário para sua recuperação. Adicionalmente, foi aferido o nível glicêmico de peixes das classes II e III submetidos às concentrações definidas previamente como ideais para cada um dos anestésicos testados (n=10 peixes/tratamento). Ambas as substâncias avaliadas são adequadas para anestesia de *A. altiparanae*. A concentração ideal de MS-222 para as três classes de tamanho foi a mesma, 90 mg L<sup>-1</sup>. As concentrações ideais de propofol para indução à anestesia cirúrgica das classes de tamanho I, II e III foram de 0,22, 0,23 e de 0,27 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Palavras-chave:** espécie-modelo, anestésico sintético, manejo, peixe

## 2.1 INTRODUÇÃO

O uso de peixes como modelo em ensaios laboratoriais, segundo Detolla *et al.* (1995) e Jenkins *et al.* (2014), tem se intensificado nas últimas décadas. Em alguns países, peixes já são o terceiro grupo animal mais utilizado em experimentos científicos (Overturf, 2009). Sabe-se, contudo, que durante as atividades de rotina em ensaios laboratoriais com peixes, assim como ocorre na aquicultura em geral, os peixes são expostos a uma variedade de fatores estressantes com elevado potencial de afetar sua condição física e seu bem-estar, como ocorre, por exemplo, durante atividades relacionadas à biometria, ao transporte, à colheita de gametas e sangue, à marcação e à identificação de indivíduos, procedimentos cirúrgicos, entre outros (Barton, 2000; Lima *et al.*, 2006; Ashley, 2007).

Com o propósito de minimizar as condições adversas decorrentes dos diferentes procedimentos de manejo, uma série de substâncias têm sido utilizadas na anestesia de peixes. Substâncias naturais, como óleos essenciais de cravo e menta têm sido amplamente utilizadas para este fim, conforme relatado por Taylor e Roberts (1999), Harper (2003) e Palić *et al.* (2006). Entretanto, os principais anestésicos empregados ainda são os sintéticos, entre eles o sulfato de quinaldina (2-metilquinolina), a benzocaína (p-aminobenzoato de etila), o 2-fenoxietanol (Inoue *et al.*, 2004; Velasco-Santamaría *et al.*, 2008; Bertozzi Júnior *et al.*, 2014), mais recentemente, o propofol (Pedrazzani e Ostrensky, 2014), e o MS-222 (tricaína metanosulfonato), o anestésico sintético mais utilizado em todo mundo (Kreiberg, 2003; Rombough, 2007; Popovic *et al.*, 2012; Sneddon, 2012b).

O MS-222 é encontrado na forma de um pó branco cristalino e tem como principais características a elevada solubilidade em água, a habilidade de promover uma rápida indução e possibilitar uma completa recuperação dos animais submetidos à anestesia. (Hseu *et al.*, 1998; Roberts, 2009; Readman *et al.*, 2013).

O MS-222 vem sendo empregado tanto em peixes continentais quanto marinhos (Lemm, 1993; Hseu *et al.*, 1998; Roubach *et al.*, 2001; Sladky *et al.*, 2001; Welker *et al.*, 2007; Ross e Ross, 2008; Zahl *et al.*, 2010; Gholipour *et*

*al.*, 2011; Stockman *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Gressler, Riffel, *et al.*, 2014; Nordgreen *et al.*, 2014). Além disso, é o único com uso autorizado pela U.S. Food and Drug Administration (Fda, 1997; Carter *et al.*, 2011; Delbon e Ranzani-Paiva, 2012).

O primeiro registro da eficácia anestésica do propofol (2,6-diisopropofol), segundo Glen (1980), foi em 1973, em um experimento com ratos. Posteriormente, Kay e Rolly (1977), foram os primeiros pesquisadores a utilizar o propofol como agente anestésico em humanos. Atualmente, de acordo com Miller e Eriksson (2009), o propofol é o anestésico mais utilizado na indução e manutenção da anestesia e sedação de vertebrados superiores, sendo amplamente utilizado na anestesia de humanos (Andrews *et al.*, 1997).

O propofol também tem sido utilizado como promotor anestésico em diferentes espécies aquáticas, como o tubarão bamboo *Chiloscyllium plagiosum* (Miller *et al.*, 2005), o golfinho nariz de garrafa *Tursiops truncatus* (Howard *et al.*, 2006), a tartaruga *Caretta caretta* (Maclean *et al.*, 2008), o caranguejo azul *Callinectes sapidus* (Quesada *et al.*, 2011), e a rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Cardoso, 2012). Estudos recentes evidenciam também a eficácia do propofol na anestesia segura de peixes, como é o caso de Fleming *et al.* (2003), com o esturjão *Acipenser oxyrinchus*; Peyghan *et al.* (2008), com a carpa-capim *Ctenopharyngodon idella*; Gressler *et al.* (2012), com o jundiá *Rhamdia quelen*; Valença-Silva *et al.* (2014), com a tilápia *Oreochromis niloticus* e Pedrazzani e Ostrensky (2014), com o peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris*.

O propofol encontra-se comercialmente disponível na forma de uma emulsão aquosa de cor esbranquiçada, na concentração de 1%, em veículo contendo 10% de óleo de soja, 2,25% de glicerol e 1,2% de lecitina de ovo purificada como surfactante (Massone, 1999; Miller e Eriksson, 2009; Meyer e Fish, 2011). Este composto popularizou-se devido a sua curta ação anestésica e rápida recuperação e por ser considerado seguro e com efeitos colaterais mínimos (Sawyer, 2008; Gomułka *et al.*, 2014).

Gholipour e Ahadizadeh (2013), afirmam porém, que a eficácia e a segurança de qualquer agente anestésico podem variar de acordo com a espécie, o estágio de vida e com as condições ambientais em que o animal se

encontra. Esses autores ressaltam que ainda são poucos os estudos que avaliam a eficácia do propofol em peixes e sugerem que mais estudos sejam realizados, para que se determinem as condições operacionais adequadas e as vantagens comparativas do uso do propofol na indução anestésica em relação a outros anestésicos empregados em peixes.

Este trabalho propõe-se a investigar o uso do MS-222 e do propofol como promotores anestésicos para a manipulação de lambaris *A. altiparanae*, em condições de laboratório, definindo as concentrações mais recomendadas para a anestesia em estágio cirúrgico para as diferentes classes de tamanho de indivíduos dessa espécie.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba/PR.

### **2.2.1 Origem e manutenção dos peixes**

Os peixes utilizados nos experimentos foram obtidos junto a uma empresa comercial sediada em Curitiba/PR. Após a recepção, os animais passaram por aclimação gradual às condições laboratoriais de temperatura e de pH da água conforme descrito no item 2.2.3. A seguir, foram acondicionados em três tanques circulares contendo sistemas internos de filtragem biológica, preenchidos com 800 L de água e mantidos sob aeração contínua. A temperatura foi controlada através do uso de termostato digital (Steck-TIC-17RGTi, Brasil) e mantida entre 24,0 e 26,0°C. Os animais foram alimentados, *ad libitum*, duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), com ração comercial contendo 45% de proteína bruta.

### 2.2.2 Biometria

Antes da classificação e de acordo com a sua classe de tamanho, os peixes foram pesados individualmente em balança digital de precisão (Shimadzu-AY220, Japão) e então medidos (comprimento total), com auxílio de um paquímetro manual (Vonder-200mm/0,05mm, Brasil). A biometria foi realizada também após a exposição aos anestésicos, ou seja, imediatamente antes da transferência dos animais para os recipientes de recuperação.

### 2.2.3 Sistema de observação

Previamente ao início dos ensaios, os peixes, já selecionados por classe de tamanho, eram coletados ao acaso dos tanques de manutenção e transferidos para os aquários de observação, onde ficavam por três dias, antes do início dos experimentos. O sistema de observação era constituído por 24 aquários retangulares de vidro (30x30x40 cm), preenchidos com 25 L de água. Os aquários eram interligados por um sistema de recirculação de água e filtros biológicos e mecânicos, e mantidos sob aeração constante. Após o período de adaptação, os peixes eram então expostos aos tratamentos anestésicos.

Durante os experimentos, eram realizados o monitoramento e o controle diário dos seguintes parâmetros físico-químicos da água nos sistemas de recirculação: pH ( $6,99 \pm 0,41$ ) (média  $\pm$  desvio padrão), através de peagâmetro digital (AZ-86505, China); temperatura ( $25,3^{\circ}\text{C} \pm 1,69$ ), oxigênio dissolvido ( $6,18 \pm 0,77$  mg/L) e percentual de saturação de oxigênio ( $75,46 \pm 8,48$ ), por meio de oxímetro digital (YSI 550A, EUA); concentração de  $\text{CO}_2$  dissolvido na água ( $1,73 \pm 0,72$  mg/L), mensurada por titulometria com hidróxido de sódio 0,02N (Apha., 2005a) e concentração de nitrogênio na forma de amônia total ( $0,16 \pm 0,4$  mg/L), obtida pelo método do indofenol (Apha., 2005b), seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA).

#### 2.2.4 Determinação das concentrações anestésicas efetivas

Soluções-estoques (10%), foram preparadas dissolvendo-se cada um dos anestésicos em água destilada. As respectivas soluções foram mantidas em frascos âmbar sob refrigeração. As soluções-teste, por sua vez, foram obtidas a partir da diluição das soluções-estoque em água proveniente do sistema de manutenção dos peixes em béqueres de 1 ou 2 L, onde os peixes foram anestesiados.

Os efeitos anestésicos do MS-222 e do propofol para *A. altiparanae* foram avaliados em duas etapas: 1) Realização de experimentos pilotos, destinados apenas à determinação das concentrações necessárias para se obter todos os cinco estágios anestésicos possíveis (Tabela 10); 2) Realização de ensaios para determinação das concentrações mais adequadas para se obter o estágio de anestesia cirúrgica dos animais, com riscos mínimos à sobrevivência dos mesmos.

Os experimentos pilotos seguiram metodologia proposta por Pedrazzani e Ostrensky (2014). Para isso, um peixe era colocado em um recipiente de vidro (Becker), contendo o respectivo anestésico na concentração desejada. Após quinze minutos de exposição, o peixe era avaliado quanto às prováveis alterações comportamentais características de cada estágio anestésico. Em conformidade com a resposta obtida, uma nova e mais elevada concentração era preparada e um novo peixe exposto individualmente ao respectivo anestésico. Esse procedimento era repetido sucessivamente até que as dosagens utilizadas fossem suficientes para promoção de todos os níveis anestésicos. Dessa forma, os experimentos pilotos foram realizados utilizando o número mínimo necessário de animais para definição das faixas de concentrações efetivas de cada anestésico. Foram consideradas seguras as concentrações que induziram a maioria dos animais ao estágio anestésico IV, porém sem causar a morte do indivíduo.

Tabela 10. Estágios de indução anestésica e comportamentos característicos avaliados para determinação da eficácia do MS-222 e do propofol, como anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae*.

Estágio anestésico	Parâmetros comportamentais
I – Sedação	Perda de reação ao toque e a estímulos visuais.
II – Anestesia leve	Início de perda de equilíbrio, caracterizado pelo movimento natatório na posição normal intercalado por movimentação irregular (lateral).
III – Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio, natação descoordenada.
IV – Anestesia cirúrgica	Mínimo movimento opercular, ausência de movimentos natatórios.
V – Colapso medular	Ausência de batimentos operculares. Elevado risco de morte.

Fonte: Adaptado de (Ross e Ross, 2008).

Para realização dos experimentos destinados à determinação das concentrações necessárias para anestesia cirúrgica (estágio IV), os animais foram separados em três diferentes classes, de acordo com seu comprimento: classe I: peixes de 1,5 a 5,0 cm; classe II: peixes de 5,1 a 8,0 cm; classe III: peixes com comprimento acima de 8,0 cm. Cinco concentrações de cada anestésico, definidas a partir dos resultados obtidos nos experimentos pilotos, foram testadas para cada uma das classes de tamanho (Tabela 11). A concentração letal é subsequente a maior concentração utilizada nos tratamentos.

Tabela 11. Concentrações de MS-222 e propofol, avaliadas para efeito anestésico para o lambari *Astyanax altiparanae* de diferentes classes de tamanho.

Composto (mg L <sup>-1</sup> )	Classe		
	I	II	III
MS-222	70; 75; 80; 85; 90	50; 60; 70; 80; 90	50; 60; 70; 80; 90
Propofol	0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25	0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25	0,24; 0,25; 0,26; 0,27; 0,28

Os animais (n=10 peixes/concentração/anestésico) foram anestesiados em béqueres de 1 L, nos testes com peixes das classes I e II e em béqueres de

2 L, nos experimentos com peixes da classe III. Os animais eram imersos individualmente, durante quinze minutos, nas soluções-teste (fase de indução anestésica). Um outro grupo de 10 peixes foi submetido ao mesmo procedimento, porém, neste caso, a imersão foi feita em água sem o uso de qualquer anestésico (branco), pelo mesmo período.

Durante a fase de indução eram cronometrados e registrados os tempos necessários para que os peixes atingissem os estágios anestésicos desejados. Posteriormente, era realizada a identificação sexual dos animais, através do dimorfismo que ocorre em relação à aspereza presente na nadadeira anal dos machos e que não ocorre em relação às fêmeas (Andrade *et al.*, 1984; Navarro *et al.*, 2006). Em seguida, os peixes eram transferidos para béqueres contendo água isenta de anestésicos (fase de recuperação). Os animais eram considerados recuperados quando retornavam à posição vertical e passavam a nadar regularmente. O tempo necessário para recuperação foi cronometrado e registrado.

Após as fases de indução e de recuperação anestésicas, os peixes foram transferidos para os aquários de manutenção e monitorados por mais 48 horas, para avaliação de eventual mortalidade e registro de seu comportamento alimentar.

#### 2.2.5 Colheita de sangue e análise dos níveis glicêmicos

Peixes da classe II e da classe III foram submetidos individualmente às concentrações previamente definidas como ideais para cada um dos anestésicos testados (n=10/classe/anestésico). Peixes do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento de manejo, porém sem a adição de qualquer substância exógena. O procedimento de indução anestésica foi semelhante ao descrito anteriormente. Ao final desse período, os peixes foram submetidos à venopunção na região caudal, com auxílio de seringas de 3 ml e agulhas de 0,55 x 20 mm, para colheita de cerca de 0,5 ml de sangue. As taxas de glicemia foram analisadas por meio de um glicosímetro digital (FreeStyle Lite®, China) e tiras analíticas (OneTouch Select, EUA). Em seguida, os animais foram transferidos para um tanque de recuperação, onde foram

mantidos em observação por 48 horas. Os peixes da classe I, por sua vez, não apresentavam volume sanguíneo suficiente para a obtenção de amostras para as análises e, por esse motivo, não foram analisados.

#### 2.2.6 Análise estatística

Foi realizada uma análise preliminar de normalidade dos dados obtidos, através do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não se ajustavam à curva normal de Gauss, os tempos de indução e recuperação anestésica dos diferentes compostos testados foram comparados estatisticamente através dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. Todos os testes foram efetuados com intervalo de confiança de 95% utilizando-se o *software* Statsoft Statistica<sup>MR</sup> versão 10.0 (StatSoft, EUA).

### 2.3 RESULTADOS

#### 2.3.1 Concentrações x estágios anestésicos atingidos

Mesmo as menores concentrações testadas, tanto no caso do MS-222 quanto no caso do propofol, foram suficientes para promover o estágio I e II de anestesia em todos os indivíduos utilizados nos ensaios. Além disso, foram, em todos os casos, identificadas concentrações que possibilitaram que parte ou que a totalidade dos organismos submetidos aos produtos testados atingissem os estágios anestésicos III e IV. Apenas no caso dos experimentos com propofol e utilizando-se indivíduos da classe III, nenhum peixe atingiu o estágio anestésico V. Em todos os outros casos, pelo menos um animal atingiu este estágio, porém nunca em proporção superior a 30% dos exemplares submetidos aos anestésicos. Nenhum peixe morreu durante o experimento (Tabela 12). Não foram observadas alterações comportamentais no tratamento sem anestésicos e nenhum peixe, de nenhuma classe de tamanho, morreu durante as 48 horas posteriores ao período de recuperação anestésica.

Tabela 12. Concentrações utilizadas para efeito anestésico de exemplares de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho I (indivíduos entre 1,5 a 5,0 cm), II (5,1 a 8,0 cm) e III (acima de 8,1 cm) e o respectivo número de indivíduos que atingiram os diferentes estágios anestésicos.

Anestésico	Classe de Tamanho	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Estágio anestésico					Mortes
			I	II	III	IV	V	
MS-222	I	70	10	10	0	0	0	0
		75	10	10	1	0	0	0
		80	10	10	3	0	0	0
		85	10	10	4	1	0	0
		90	10	10	10	7	1	0
	II	50	10	10	0	0	0	0
		60	10	10	3	0	0	0
		70	10	10	2	0	0	0
		80	10	10	8	3	0	0
		90	10	10	10	7	1	0
	III	50	10	10	0	0	0	0
		60	10	10	1	0	0	0
		70	10	10	4	0	0	0
		80	10	10	10	9	0	0
		90	10	10	10	10	1	0
PROPOFOL	I	0,21	10	10	10	10	0	0
		0,22	10	10	10	9	0	0
		0,23	10	10	10	10	0	0
		0,24	10	10	10	10	0	0
		0,25	10	10	10	10	2	0
	II	0,21	10	10	8	7	0	0
		0,22	10	10	9	9	0	0
		0,23	10	10	9	9	0	0
		0,24	10	10	9	8	0	0
		0,25	10	10	10	10	3	0
	III	0,24	10	10	0	0	0	0
		0,25	10	10	3	0	0	0
		0,26	10	10	9	7	0	0
		0,27	10	10	10	9	0	0
		0,28	10	10	10	9	0	0

### 2.3.2 Influência do peso individual sobre o tempo de indução e de recuperação anestésica

Os tempos de indução e de recuperação anestésica em função do peso individual dos peixes utilizados e das concentrações testadas estão apresentados na Figura 5. Nos ensaios com o MS-222, observou-se que tanto

o peso dos animais quanto as concentrações utilizadas tiveram pouca influência sobre o tempo de indução anestésica ao estágio cirúrgico. O tempo de recuperação anestésica também não foi afetado pelo peso dos animais, mas houve uma clara influência da concentração do anestésico sobre tempo de recuperação do animal. Dois grupos foram observados, um envolvendo as concentrações inferiores a  $70 \text{ mg L}^{-1}$ , que apresentou tempo de recuperação mais curto, e o grupo dos peixes submetidos a concentrações entre  $70$  e  $90 \text{ mg L}^{-1}$ , cujo tempo de recuperação foi duas vezes maior.

Já em relação ao propofol, houve uma menor influência das concentrações utilizadas e uma maior influência do peso dos indivíduos sobre o tempo de anestesia em nível cirúrgico. Indivíduos maiores que  $25 \text{ g}$  apresentaram menor tempo de indução. Por outro lado, em relação à recuperação da anestesia a situação se inverteu. O peso dos peixes teve muito pouca influência sobre o tempo de recuperação, que foi bastante influenciado pela concentração de propofol utilizada.

Não houve correlação significativa entre o tempo de indução e de recuperação anestésica nem em relação aos peixes submetidos ao MS-222 ( $p=0,16$ ) e nem em relação ao propofol ( $p=0,59$ ).

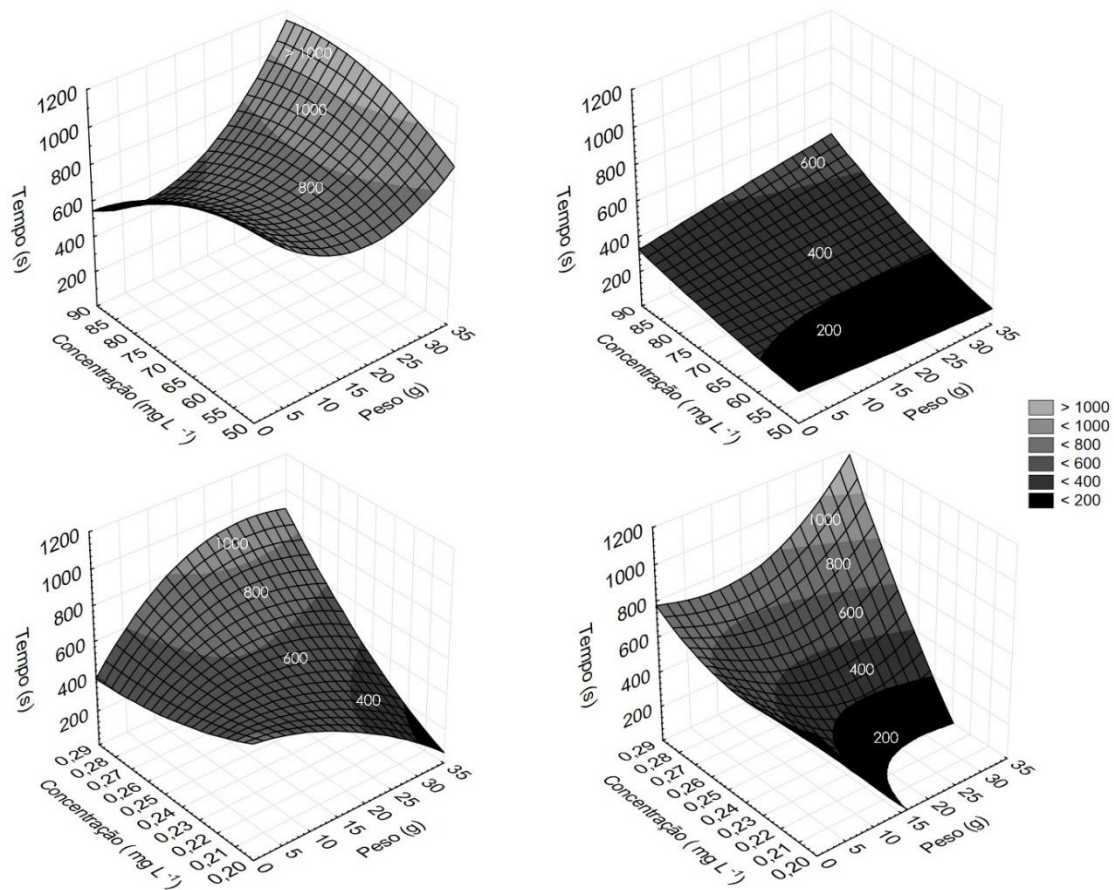


Figura 5. Tempos de indução anestésica ao estágio cirúrgico (esquerda) e de recuperação anestésica (direita) em relação à concentração e ao peso de *Astyanax altiparanae* submetidos ao MS-222 (superior) e ao propofol (inferior).

### 2.3.3 Concentrações ideais de cada anestésico

Com base no conjunto de resultados obtidos, foram selecionadas e avaliadas, de forma comparativa, as concentrações anestésicas em que os peixes de cada classe de tamanho atingiram todos os seguintes critérios preestabelecidos: a) a maioria dos indivíduos testados deveria atingir o estágio anestésico cirúrgico (estágio IV); b) não mais que 30% dos indivíduos testados poderia atingir o estágio anestésico V; c) a mortalidade máxima deveria ser inferior a 10% dos indivíduos testados.

Peixes da classe I expostos ao MS-222 apresentaram menor tempo de indução e maior tempo de recuperação anestésicas na concentração de 90 mg L<sup>-1</sup> em relação à concentração de 85 mg L<sup>-1</sup>. No caso do propofol, houve

diferenças entre as concentrações testadas apenas em relação ao tempo de indução anestésica ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

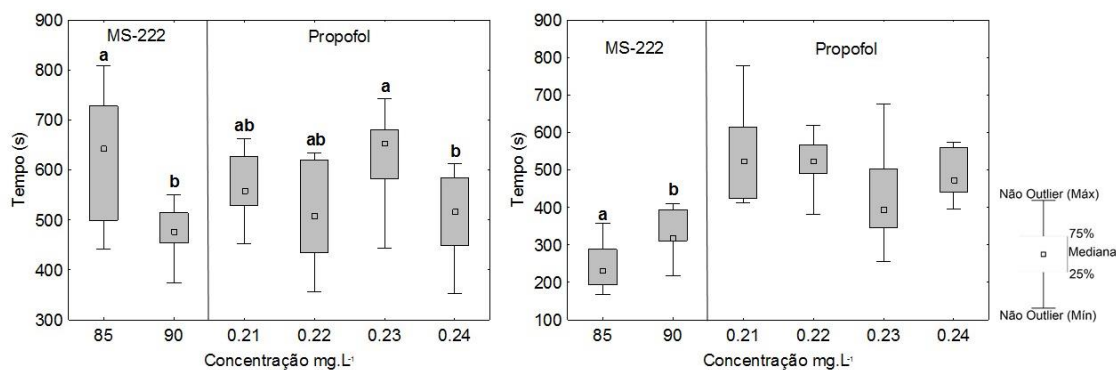


Figura 6. Tempos de indução (esquerda) e de recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho I (indivíduos entre 1,5 e 5,0 cm) submetidos ao MS-222 e ao propofol que atingiram o estágio de anestesia cirúrgica. Letras distintas indicam diferença estatística quando comparados os tempos de indução e de recuperação para as concentrações testadas de um mesmo anestésico.

O mesmo padrão foi, em linhas gerais, observado em relação aos peixes da classe II. Nesse caso, entretanto, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tempos necessários para a indução anestésica dos peixes expostos ao propofol (Figura 7).

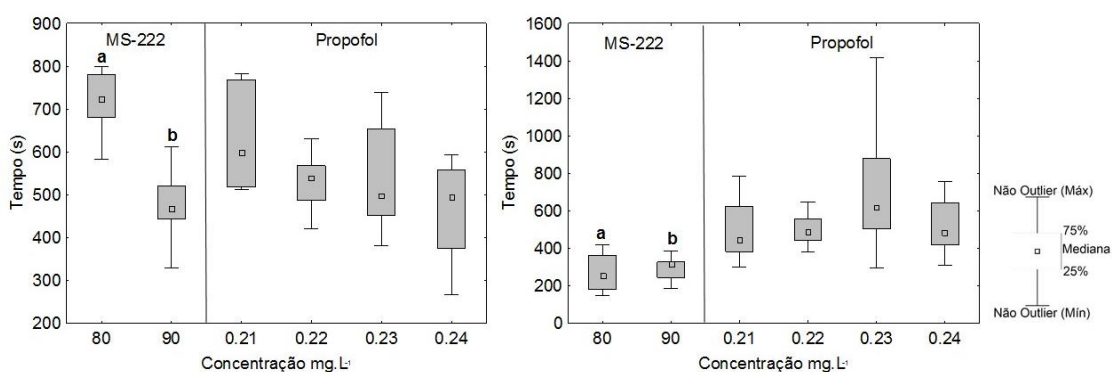


Figura 7. Tempos de indução (esquerda) e de recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho II (indivíduos entre 5,1 e 8,0 cm) submetidos ao MS-222 e ao propofol que atingiram o estágio de anestesia cirúrgica. Letras distintas indicam diferença estatística quando comparados os tempos de indução e de recuperação para as concentrações testadas de um mesmo anestésico.

Em relação aos peixes da classe III, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos tempos de indução ou nos tempos de recuperação

anestésica em relação a nenhuma das concentrações testadas de cada anestésico (Figura 8).

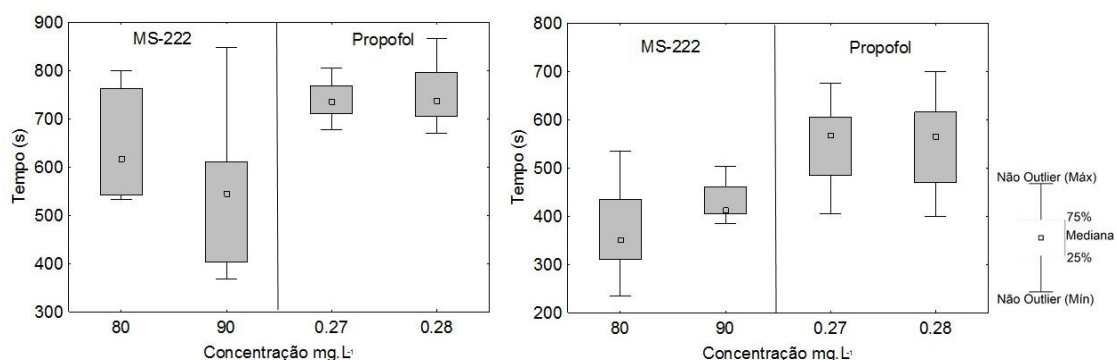


Figura 8. Tempos de indução (esquerda) e de recuperação anestésicas (direita) de *Astyanax altiparanae* da classe de tamanho III (indivíduos acima de 8,1 cm) submetidos ao MS-222 e ao propofol que atingiram o estágio de anestesia cirúrgica. Letras distintas indicam diferença estatística quando comparados os tempos de indução e de recuperação para as concentrações testadas de um mesmo anestésico.

Com base nesses resultados foram então definidas às concentrações recomendadas de cada anestésico para as diferentes classes de tamanho de *A. altiparanae*. Procurou-se sempre utilizar a menor concentração possível para se obter o efeito desejado. Os tempos esperados para o alcance do estágio anestésico cirúrgico e de recuperação em relação a cada uma das concentrações recomendadas são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Concentrações ideais e tempos (s) esperados (medianas  $\pm$  50%) de indução e recuperação anestésicas das classes de tamanho I, II e III de *Astyanax altiparanae* submetidos ao MS-222 e propofol.

Anestésico	Classe de Tamanho	Concentração mg L <sup>-1</sup>	Tempo esperado de indução (s)	Tempo esperado de recuperação (s)
MS-222	I (1,5 - 5 cm)	90	476 (454-514)	320 (311-394)
	II (5,1 - 8,0 cm)	90	469 (443-521)	313 (243-325)
	III (> 8,1 cm)	90	545,5 (403-611)	413,5 (405,5-460)
Propofol	I (1,5 - 5 cm)	0,22	508 (434-620,5)	523 (490-566)
	II (5,1 - 8,0 cm)	0,23	497 (452-653)	617 (501-877)
	III (> 8,1 cm)	0,27	737 (710-767)	568 (485-605)

### 2.3.4 Níveis glicêmicos

Não foram observadas diferenças significativas em relação aos níveis glicêmicos e nem ao sexo dos indivíduos das classes de tamanho II e III submetidos aos diferentes compostos anestésicos nas concentrações consideradas ideais definidas anteriormente (Tabela 14).

Tabela 14. Níveis glicêmicos médios de lambaris *Astyanax altiparanae* de sexos e classes de tamanho distintos (II – animais entre 5,1 e 8,0 cm; e III – animais maiores que 8 cm), anestesiados com as concentrações de MS-222 e de propofol, definidas como ideais para cada classe.

Anestésico	Parâmetro	Variável	(n)	Glicemia (mg/dL)	p*
MS-222	Sexo	F	11	53,7 ( $\pm$ 16,2)**	0,32
		M	9	69,8 ( $\pm$ 19,4)	
	Classe	II	10	71,5 ( $\pm$ 22,6)	0,08
		III	10	55,1 ( $\pm$ 17,4)	
Propofol	Sexo	F	11	65,8 ( $\pm$ 20,8)	0,05
		M	9	50,4 ( $\pm$ 16,8)	
	Classe	II	10	65,9 ( $\pm$ 22,0)	0,08
		III	10	61,9 ( $\pm$ 16,4)	
Branco	Sexo	F	13	59,6 ( $\pm$ 16,5)	0,93
		M	7	63,1 ( $\pm$ 23,9)	
	Classe	II	10	66,6 ( $\pm$ 21,1)	0,96
		III	10	55,1 ( $\pm$ 17,4)	
Probabilidade					
Anestésicos		0,95			
Sexo		0,09			
Classe		0,32			

\* Probabilidade calculada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis

\*\* Valores entre parênteses representam o erro padrão das respectivas médias apresentadas

## 2.4 DISCUSSÃO

De acordo com Noga (1996) e Ross & Ross (2008), a indução anestésica em peixes deve ocorrer rapidamente, preferencialmente em um período de três a cinco minutos, promovendo mínima reação de hiperatividade ou de estresse. A recuperação também deve ser rápida, com duração recomendada de cinco a dez minutos após os animais serem transferidos para água sem anestésicos (Marking e Meyer, 1985; Roubach e Gomes, 2001).

Os resultados aqui obtidos sugerem que uma mesma concentração de MS-222 (90 mg L<sup>-1</sup>), pode ser utilizada para a anestesia de *A. altiparanae*, independentemente da classe de tamanho dos animais. Este valor é compatível com o recomendado por outros pesquisadores (cujas concentrações variam de 70 a 168 mg L<sup>-1</sup>) para peixes de diferentes espécies com peso de um a 1 até mais de 30 g) (Tabela 15).

Roubach *et al.* (2005) e Zahl *et al.* (2011) afirmaram que peixes menores, por apresentarem superfície branquial reduzida, demandam concentrações menores de anestésico. Essa tendência, foi aqui observada apenas quando da comparação entre os resultados obtidos para animais das classes de tamanho I e III expostos ao propofol. Mas, não é suficiente para explicar as diferenças entre as concentrações aqui recomendadas de propofol para *A. altiparanae* (0,22, 0,23 e 0,27 mg L<sup>-1</sup>, para indivíduos das classes I, II e III, respectivamente) em relação aos 2,5 e aos 6,99 mg L<sup>-1</sup> recomendados para anestesia de *Rhamdia quelen* (Gressler *et al.*, 2012) e de *Carassius auratus* (Gholipour e Ahadizadeh, 2013), respectivamente, que utilizaram animais de tamanhos compatíveis com os aqui testados. Nesse caso, portanto, é provável que a diferença seja mesmo um critério espécie específico.

Importante, porém, é que no presente caso, tanto as concentrações recomendadas de MS-222 e de propofol apresentaram grande margem de segurança, pois não ocorreu nenhuma morte de animais expostos a tais concentrações durante a exposição ou nas 48 h subsequentes.

Tabela 15. Tempo de indução (estágio cirúrgico) e de recuperação anestésica de diferentes espécies de peixes utilizando diferentes compostos sintéticos.

MS-222						
Espécie	Peso (g)	Comprimento (cm)	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de indução (s)	Tempo de recuperação (s)	Autores
<i>Brycon cephalus</i>	31,5 ± 8,1	-	100	175,8	191,4	(Roubach <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ictalurus punctatus</i>	18,4 ± 1,1	-	180	408	222	(Welker <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pagellus bogaraveo</i>	10,8 ± 5,3	-	70	283,8	103,8	(Maricchiolo e Genovese, 2011)
<i>Puntius denisonii</i>	16,5 ± 3,5	-	100	506	165	(Mercy <i>et al.</i> , 2013)
<i>Danio rerio</i>	0,25 ± 0,03	-	168	101,9	92	(Nordgreen <i>et al.</i> , 2014)
Propofol						
<i>Rhamdia quelen</i>	4,7 ± 1,1	8,23 ± 0,12	2,5	139,2	561,1	(Gressler <i>et al.</i> , 2012)
<i>Carassius auratus</i>	8,0 ± 2,0	10,0 ± 2,0	6,99	444	511,2	(Gholipour e Ahadzadeh, 2013)

De acordo com Park *et al.* (2008), além da concentração utilizada, a determinação do tempo de exposição é essencial para a eficácia do anestésico, uma vez que exposições prolongadas podem eventualmente aumentar as taxas mortalidade dos peixes. No presente estudo, o MS-222 proporcionou tempos de resposta à indução ao estágio de anestesia cirúrgica 5,6 a 26,0% menores que os proporcionados pelo propofol. Já em relação ao tempo de recuperação anestésica essa diferença foi ainda maior, variando de 27,2 a 49,2%, dependendo da classe de tamanho dos animais utilizados. Essa é uma evidente vantagem do MS-222 em relação ao propofol, especialmente nos casos em que há necessidade de maior rapidez durante o manejo.

Contudo, em casos específicos, como em procedimentos que demandam maior tempo de anestesia, como acontece em casos de reprodução induzida ou em cirurgias, um período mais prolongado de anestesia

pode ser não apenas positivo, mas necessário (Prince e Powell, 2000). Assim, para esses casos, o propofol se mostra potencialmente mais adequado.

Outra vantagem do propofol é que ele pode ser utilizado na forma injetável, mesmo para peixes, como já descrito por Fleming *et al.* (2003), Peyghan *et al.* (2008) e Gomulka *et al.* (2014). Já o MS-222 não apresenta essa facilidade. Porém, como a forma injetável requer a contenção física do animal e pode causar dor, possíveis injúrias físicas e estresse, essa é uma vantagem apenas relativa e talvez só faça sentido quando da utilização de peixes de grande tamanho.

A avaliação de diferentes parâmetros sanguíneos, pode constituir uma importante ferramenta na determinação de concentrações ótimas de diferentes anestésicos e indicar o nível de estresse dos peixes durante sua manipulação (Feng *et al.*, 2011). Contudo, a dificuldade de obtenção de volumes significativos de sangue dos indivíduos de *A. altiparanae*, especialmente os da classe I, limitaram a possibilidade de análise de outros parâmetros sanguíneos além da glicemia.

Ainda assim, a glicemia tem se tornado um parâmetro frequente nos estudos com anestesia de peixes. Roubach *et al.* (2001), observaram alterações no padrão glicêmico de juvenis da matrinxã *Brycon cephalus* expostos a concentrações de 200 e 300 mg L<sup>-1</sup> de MS-222. *Ictalurus punctatus* foram submetidos por Welker *et al.* (2007), a uma concentração de MS-222 duas vezes maior que a utilizada neste trabalho e os peixes também apresentaram alterações nas taxas glicêmicas após a exposição. Estes pesquisadores sugerem que altas concentrações de MS-222 podem ocasionar estresse nos animais e consequente alteração no quadro glicêmico. Contudo, o incremento das taxas glicêmicas decorrentes da exposição a agentes anestésicos também pode ser descrito como consequência do aumento da liberação de catecolaminas na corrente sanguínea em razão da hipóxia causada pela supressão da respiração dos peixes durante a anestesia ou ainda como uma resposta adaptativa ao agente estressor (Iwama *et al.*, 1989; Fabbri *et al.*, 1998; Pankhurst, 2011).

Gressler, Sutili, *et al.* (2014), submeteu juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* a concentrações de 0,4 e 0,8 mg L<sup>-1</sup>, concentrações relativamente

próximas as utilizadas neste trabalho e não observou diferenças no índice glicêmico. Entretanto, Gomulka *et al.* (2014), avaliaram parâmetros hematológicos de indivíduos de *Coregonus sp.* (*European whitefish*), anestesiados com 5 mg L<sup>-1</sup> de propofol e concluíram que houve diferenças nas taxas glicêmicas após os tratamentos. Estes pesquisadores afirmam que procedimentos que favoreçam a incidência de estresse em peixes são acompanhados pelo aumento da glicose sanguínea e conseqüentemente da gliconeogênese, porém ressaltam que não é possível afirmar qual a intensidade e quais tipos de manejo favoreçam de forma significativa estas alterações. De acordo com (Takahashi *et al.* (2008)), fatores como tamanho dos peixes, sexo, espécie, tipo, intensidade e severidade do agente estressor também podem colaborar para alterações na glicose sanguínea circulante, entretanto estes fatores ainda precisam ser melhor esclarecidos para que seja possível concluir sobre a ação do propofol na homeostase sanguínea de peixes anestesiados com este agente.

No presente estudo, porém, todos os animais foram expostos às mesmas condições de manejo durante os ensaios e não foram registradas diferenças nas taxas glicêmicas em relação a nenhum dos anestésicos utilizados, nem para peixes de sexo e nem de tamanhos distintos. Esse resultado reforça a convicção de que tanto o MS-222 quanto o propofol apresentaram resultados bastante satisfatórios e apropriados para a anestesia de *A. altiparanae*. Neste caso, a escolha sobre qual produto deve ser utilizado dependerá do manejo a ser empregado e deverá considerar as características relacionadas aos períodos de indução e recuperação anestésicas proporcionado por cada um deles, além de fatores como custo e facilidade de obtenção dos produtos.

## REFERÊNCIAS

ABREU, J. S.; ESTEVES, F. R.; URBINATI, E. C. **Stress in pacu exposed to ammonia in water.** R. Bras. Zootec. 41: 1555-1560 p. 2012.

AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.

ALBERTO, A. et al. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 247-255, 2005.

ANDRADE, D. R.; MENIN, E.; RIBEIRO, S. P. **Periodicidade da característica sexual secundária em *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) Pisces, Characidae.** Revista Seiva. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 44: 9-12 p. 1984.

ANDREWS, D. T. et al. The arterial blood propofol concentration preventing movement in 50% of healthy women after skin incision. **Anesth. Analg.**, v. 85, n. 2, p. 414-419, 1997.

APHA., A. P. H. A. Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500-CO<sub>2</sub> C., v. 21, 2005a.

APHA., A. P. H. A. Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114., v. 21, 2005b.

ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3-4, p. 199-235, 5// 2007. ISSN 0168-1591. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168159106002954> >. Acesso em: 2014/09/20.

BACKUS, B. L.; MCGLONE, J. J.; GUAY, K. Animal Welfare: Stress, Global Issues, and Perspectives. In: ALFEN, N. K. V. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems.** Oxford: Academic Press, 2014. p.387-402. ISBN 978-0-08-093139-5.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000/01/01 2000. ISSN 1522-2055. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2) >. Acesso em: 2014/10/29.

BELL, G. An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. **Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.** , p. pp.16, 1987.

BERNARDES JÚNIOR, J. J. et al. Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1140-1144, 2013. ISSN 0100-204X. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2013000800052&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2013000800052&nrm=iso) >.

BERTOZI JÚNIOR, M. et al. Benzocaine and eugenol as anesthetic for *Pimelodus britskii* ('mandi-pintado') juveniles. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 1, p. 134-138, 2014.

BURKA, J. F. et al. Drugs in salmonid aquaculture - A review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.**, v. 20, n. 5, p. 333 - 349, 1997.

CARBONE, L. Chapter 11 - Euthanasia and Laboratory Animal Welfare. In: TURNER, K. B. V. (Ed.). **Laboratory Animal Welfare**. Boston: Academic Press, 2014. p.157-169. ISBN 978-0-12-385103-1.

CARDOSO, J. L. **Efeito do propofol na dose 20 mg/kg via intracelomática em rãs touro *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802.** 2012. 42 (M. Sc). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, MG

CARTER, K.; WOODLEY, C.; BROWN, R. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 1, p. 51-59, 2011/03/01 2011. ISSN 0960-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-010-9188-0> >.

CHAGAS, E. C. et al. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com b-glucano. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 221-227, 2012.

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS-222) and clove oil anaesthesia 232 effects on the physiology of juvenile chinook

salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, p. 537-546., 2000.

COSENZA, G. R. et al. Influence of glyceryl guaiacolate ether on anesthetics in tilapia compared to benzocaine and eugenol. **Revista MVZ Córdoba**, v. 19, p. 3944-3953, 2014. ISSN 0122-0268. Disponível em: < [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682014000100004&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682014000100004&nrm=iso) >.

COTTER, P. A.; RODNICK, K. J. Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 158–165, 2006.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, H. J. Anaesthetics in aquaculture. **SRAC Publication. No. 3900. Southern Regional Aquaculture Center, USA.**, p. pp. 6, 2004.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology.**, v. 69, p. 1504-1512, 2006.

CUNHA, M. A. D. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural, Santa Maria. RS**, v. 40, n. 10, p. 2107-2114, 2010. ISSN 0103-8478.

DELBON, M. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Eugenol em juvenis de tilápia do nilo: concentrações e administrações sucessivas. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 38, n. 1, p. 43-52, 2012.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR**, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DETOLLA, L. J. et al. Guidelines for the care and use of fish in research. **ILAR Journal**, v. 37, n. 4, p. 159-173, January 1, 1995 1995. Disponível em: < <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/37/4/159.short> >.

DIEMER, O. et al. Eugenol as anesthetic for silver catfish (*Rhamdia voulezi*) with different weight. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR**, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T. W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. **Comparative**

**Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 120, n. 2, p. 177-192, 8// 1998. ISSN 0742-8413. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0742841398100178> >.

FABIANI, B. M. et al. Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brycon hilarii*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR**, v. 35, n. 2, p. 113-117, 2013. ISSN 1807-8672.

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

FDA. ANADA 200-226 Tricaine-S - Original approval. 1997. Disponível em: < <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/OIADrugSummaries/ucm132992.htm> >. Acesso em: 10/29/.

FENG, G. et al. Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 2, p. 595-599, 2011. ISSN 1439-0426. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01711.x> >.

FERREIRA, P. D. M. F. et al. Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. **Journal of the world aquaculture society**, v. 45, n. 1, p. 28-34, 2014.

FLEMING, G. J. et al. Evaluation of propofol and medetomidine–ketamine for short-term immobilization of gulf of mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* de Soti). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 2, p. 153-158, 2003.

GARUTTI, V. **Piscicultura Ecológica**. São Paulo, SP: Fundação Editora da UNESP - FEU, 2003. 335.

GHOLIPOUR, K. H.; AHADIZADEH, S. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 76, p. 2-5, 2013.

GHOLIPOUR, K. H. et al. Anesthetic effect of tricaine methanesulfonate, clove oil and electroanesthesia on lysozyme activity of *Oncorhynchus mykiss*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 3, p. 393-402, 2011.

GLEN, J. B. Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868. **British Journal of Anaesthesia**, v. 52, n. 8, p. 731-742, August 1, 1980 1980. Disponível em: < <http://bj.oxfordjournals.org/content/52/8/731.abstract> >.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. D. Potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal. Uberlândia, MG**, v. 28, n. 2, p. 297-301, 2012.

GOMUŁKA, P. et al. The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European Whitefish. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, p. 331-337, 2014. ISSN 1303-2712.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá, PR**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Transporte de juvenis de curimatã *Prochilodus lineatus* em diferentes densidades. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá, PR.**, v. 32, n. 2, p. 205-211, 2010.

GRESSLER, L. T. et al. Immersion anaesthesia with tricaine methanesulfonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 1436-1445, 2012.

GRESSLER, L. T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 6, p. 1061-1072, 2014. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/are.12043> >.

GRESSLER, L. T. et al. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-10, 2014/10/02 2014. ISSN 0920-1742. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-014-9997-5> >.

HARPER, C. **Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish.** . Aquaculture Magazine: 41-42 p. 2003.

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural, Santa Maria, RS**, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009. ISSN 0103-8478.

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 445 - 452, 2009.

HOWARD, R. S.; FINNERAN, J. J.; RIDGWAY, S. H. Bispectral index monitoring of unihemispheric effects in dolphins. **Anesthesia & Analgesia**, v. 103, n. 3, p. 626-632 10.1213/01.ane.0000231656.38488.b4, 2006. ISSN 0003-2999. Disponível em: < [http://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2006/09000/Bispectral\\_Index\\_Monitoring\\_of\\_Unihemispheric.19.aspx](http://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Fulltext/2006/09000/Bispectral_Index_Monitoring_of_Unihemispheric.19.aspx) >.

HSEU, J.-R. et al. Comparison of efficacy of five anesthetics in Goldlined Sea Bream, *Sparus sarba*. **Acta Zoologica Taiwanica**, v. 9, n. 1, p. 35, 1998.

INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguaiana**, v. 2, p. 10-15, 2004.

IWAMA, G. K.; MCGEER, J. C.; PAWLUK, M. P. The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 8, p. 2065-2073, 1989/08/01 1989. ISSN 0008-4301. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/z89-294> >. Acesso em: 2014/11/11.

JENKINS, J. A. et al. Guidelines for the use of fishes in research - Revised and expanded, 2014. **Fisheries**, v. 39, n. 9, p. 415-416, 2014/09/02 2014. ISSN 0363-2415. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03632415.2014.924408> >. Acesso em: 2014/10/29.

KAY, B.; ROLLY, G. I.C.I. 35868, a new intravenous induction agent. **Acta Anaesthesiol Belg.**, v. 28, n. 4, p. 303-316, 1977.

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

KREIBERG, H. **Stress and anesthesia**. In: **G. K. Ostrander (Ed.)** Academic Press, London: 2003.

LAW, J. M. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. **Toxicol Pathol**, v. 31, p. 49-52, 2003.

LEMM, C. A. **Evaluation of five anesthetics on striped bass (*Morone saxatilis*)**. National Fisheries Research Center. Kearneysville, WV, p.17. 1993

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Rev. Bras. de Reprod. Anim. Belo Horizonte, MG**, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2006.

LISBOA, B. D. C. et al. **Comparação da eficiência de dois anestésicos, mentol e eugenol, utilizados no peixe borboleta, *Thoracocharax stellatus* (Kner, 1858) (Characiformes: Gasteropelecidae).** XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES: 1-3 p. 2014.

MACLEAN, R. A.; HARMS, C. A.; BRAUN-MCNEILL, J. Propofol anesthesia in loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 1, p. 143-150, 2008/01/01 2008. ISSN 0090-3558. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-44.1.143> >. Acesso em: 2014/10/30.

MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **The Open Marine Biology Journal**, v. 511, p. 24-33, 2011.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

MARTINS, M. L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

MASSONE, F. **Anestesia veterinária. Farmacologia e técnicas**. 3.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221-228, 2010.

MERCY, T. V. A.; MALIKA, V.; SAJAN, S. Use of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anaesthesia in *Puntius denisonii* (Day, 1865) (Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae), a threatened barb of the Western Ghats, India. **Journal of Threatened Taxa**, v. 5, n. 9, p. 4414-4419, 2013. ISSN 0974-7907.

MEYER, R. E.; FISH, R. E. Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**, p. 27-82, 2011.

MILLER, R. D.; ERIKSSON, L. I. **Miller's Anesthesia**. Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. ISBN 9780443069598. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=HPpgOjIGYtAC> >.

MILLER, S. M. et al. Clinical and cardiorespiratory effects of propofol in the spotted bamboo shark (*Chylloscyllium plagiosum*). **J Zoo Wildl Med.**, v. 36, n. 4, p. 673-676, 2005.

MOREIRA, A. G. L. et al. Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromatica* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences, Maringá, PR.**, v. 32, n. 4, p. 419 - 423, 2010.

MOREIRA, A. G. L. et al. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 12, n. 3, p. 794-804, 2011. ISSN 1519 9940.

MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Measurements of stressed states in the field. In Iwama, G.W.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (Eds.). . **Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: University Press.**, p. 247-270, 1997.

NAVARRO, R. D. et al. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. . **Zootecnia Tropical**, v. 24, n. 2, p. 165-176, 2006.

NOGA, E. J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment.** Wiley, 1996. ISBN 9780813825588. Disponível em: <  
<http://books.google.com.br/books?id=SAdDtT7YRRoC> >.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C. D.; SÁ, O. R. D. **Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG.** Revista Brasileira de Zootecnia. Juiz de Fora, MG: Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. 11 (3): 237-232 p. 2009.

NORDGREEN, J. et al. Behavioural effects of the commonly used fish anaesthetic tricaine methanesulfonate (MS-222) on Zebrafish (*Danio rerio*) and its relevance for the acetic acid pain test. **PLoS ONE e92116**, v. 9, n. 3, 2014.

OVERTURF, K. Convergence of aquaculture and molecular biology. In: (Ed.). **Molecular Research in Aquaculture:** Wiley-Blackwell, 2009. p.1-13. ISBN 9780813807379.

PÁDUA, S. B. et al. Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Bol. Inst. Pesca, São Paulo, SP**, v. 36, n. 2, p. 143-148, 2010.

PALIĆ, D. et al. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, v. 254, n. 1–4, p. 675-685, 4/28/ 2006. ISSN 0044-8486. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848605006605> >.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265-275, 1/15/ 2011. ISSN 0016-6480. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648010002650> >.

PARK, M. O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 8, p. 877-884, 2008. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x> >.

PEDRAZZANI, A. S.; OSTRENSKY, A. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, v. 45, n. 8, p. 1-8, 2014. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/are.12535> >.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M. et al. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural, Santa Maria. RS**, v. v. 39, n. n. 6, p. p. 1851-1856, 2009. ISSN 0103-8478.

PEYGHAN, R. et al. Anesthesia with propofol in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, and its effects on electrocardiogram, blood gases and pH. **Iranian journal of veterinary surgery**, v. 3, n. 4, p. 9-18, 2008.

POPOVIC, N. et al. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 4, p. 553-564, 2012. ISSN 1439-0426. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x> >.

PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 20, n. 4, p. 1029 - 1032, 2000.

QUESADA, R. J.; SMITH, C. D.; HEARD, D. J. Evaluation of parenteral drugs for anesthesia in the blue crab (*Callinectes sapidus*). v. 42, n. 2, p. 295-299, 2011.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GODINHO, H. M. Características do plasma sanguíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições experimentais de criação. **B. Inst. Pesca, São Paulo.**, v. 15, n. 2, p. 169 - 177, 1988.

READMAN, G. D. et al. Do fish perceive anaesthetics as aversive? **PLoS ONE** **e73773**, v. 8, n. 9, 2013.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Tricaine as an anaesthetic for larvae and juveniles of *Lophosilurus alexandri*, a carnivorous freshwater fish. **Aquaculture Research**, p. 1-5, 2013. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/are.12316> >.

ROBERTS, H. E. **Fundamentals of ornamental fish health**. Wiley, 2009. 288 ISBN 9780813808130. Disponível em: < <http://books.google.com.au/books?id=SWpwSAcRKvUC> >.

ROCHA, M. A. D. et al. Determinação da dose ótima de cloridrato de benzocaína na anestesia de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR**, v. 33, n. 6, p. 2403-2409, 2012.

ROMBOUGH, P. J. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS-222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 2, p. 463-469, 10// 2007. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643307014651> >.

ROSS, L. G.; ROSS, B. In: (Ed.). **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**: Blackwell Publishing Ltd., 2008. p.i-xv. ISBN 9781444302264.

ROTILI, D. A. et al. Uso de eugenol como anestésico em pacu. **Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, GO.**, v. 42, n. 3, p. 288-294, 2012.

ROUBACH, R.; GOMES, L. **Uso de anestésicos durante o manejo de peixes**. Panorama da Aquicultura. Rio de Janeiro, RJ. 11: 37-40 p. 2001.

ROUBACH, R.; GOMES, L.; VAL, A. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. **Acta Amazonica**, v. v. 31, n. n. 1, p. p. 159-163, 2001.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research.**, v. 36, n. 11, p. 1056 - 1061., 2005.

SANCHEZ, M. S. D. S. et al. Respostas fisiológicas de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a anestésicos naturais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina, PR.**, v. 35, n. 2, p. 1061-1070, 2014.

SANTOS, L. P. D. et al. Cytogenetic analysis in the neotropical fish *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Characidae, incertae sedis): karyotype description and occurrence of B microchromosomes. **Molecular Cytogenetics**, v. 6, n. 48, 2013.

SAWYER, D. **The practice of veterinary anesthesia: Small animals, birds, fish and reptiles.** Teton NewMedia, Incorporated, 2008. ISBN 9781591610342. Disponível em: <  
<http://books.google.com.br/books?id=gCHIAgAAQBAJ> >.

SILVA, L. D. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

SILVA, N. J. R. et al. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no estado de São Paulo, Brasil. **Informações Econômicas**, v. 41, n. 9, p. 17-28, 2011.

SILVA, R. B. D. et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. (Supl.1), p. 99-107, 2012.

SLADKY, K. K. et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SMITH, S. A. Chapter 17 - Welfare of laboratory fishes. In: TURNER, K. B. V. (Ed.). **Laboratory Animal Welfare.** Boston: Academic Press, 2014. p.301-311. ISBN 978-0-12-385103-1.

SNEDDON, L. U. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 1, p. 32-43, 1// 2012a. ISSN 1557-5063. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506311002266> >.

SNEDDON, L. U. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 1, p. 32-43, 1// 2012b. ISSN 1557-5063. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506311002266> >.

SOUZA, R. A. R. D. et al. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo, SP**, v. 38, n. 3, p. 247-255, 2012.

STOCKMAN, J. et al. Physiologic and biochemical measurements and response to noxious stimulation at various concentrations of MS-222 in Koi (*Cyprinus carpio*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 40, p. 35–47 2012.

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

TAKAHASHI, L. S. et al. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 4, p. 469-475, 2008. ISSN 1807-8672.

TAYLOR, P. W.; ROBERTS, S. D. Clove oil: An alternative anaesthetic for aquaculture. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, n. 2, p. 150-155, 1999/04/01 1999. ISSN 1522-2055. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8454%281999%29061%3C0150%3ACOAAAF%3E2.0.CO%3B2> >. Acesso em: 2014/10/29.

VALENÇA-SILVA, G. et al. Low dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile tilapia. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 143, n. 2, p. 414-419, 2014/03/04 2014. ISSN 0002-8487. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00028487.2013.856814> >. Acesso em: 2014/11/03.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; PALACIOS-RUIZ, C.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Eficiencia anésteica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y metassulfonato de tricaina en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). **Rev. MVZ Córdoba**, v. 13, n. 3, p. 1335-1445, 2008.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1069-1074, 2008. ISSN 0100-204X. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2008000800017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008000800017&nrm=iso)>.

VIDAL, L. V. O. et al. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biol. Sci. Maringá, PR**, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.

WELKER, T.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M. Effect of buffered and unbuffered tricaine methanesulfonate (MS-222) at different concentrations on the stress responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 19, n. 3, 2007.

WINKALER, E. U. et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum, Maringá, PR**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 9, p. 1235-1245, 2011. ISSN 1365-2109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02711.x>>.

ZAHL, I. H. et al. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 719-730, 2010.

### **CAPÍTULO 3. USO DE ANESTÉSICOS NO MANEJO DE LAMBARIS *Astyanax altiparanae* EM LABORATÓRIO.**

**André Luiz Vicente & Antonio Ostrensky.**

Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

**Correspondência: E-mail:** André Luiz Vicente, Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná. Rua dos Funcionários, 1540, Cabral, Curitiba, Paraná, 800350-050, Brasil. E-mail: [andreluizgia@gmail.com.br](mailto:andreluizgia@gmail.com.br)

Lambaris constituem um grupo de peixes de grande importância econômica e ecológica, em especial pela grande demanda para consumo *in natura*, como isca-viva para pesca esportiva e na alimentação de outras espécies de peixes carnívoros. Considerado uma espécie de peixe de elevada rusticidade, produtividade e de fácil manejo em condições de cultivo, o lambari tem sido frequentemente utilizado como bioindicador e como espécie modelo em ensaios laboratoriais.

Procedimentos de rotina em produção e em pesquisa relacionadas à piscicultura são potenciais causadores de estresse. Atividades de manejo como identificação de matrizes, injeção de hormônios para reprodução, obtenção de sangue e tecidos para análises laboratoriais, vacinação, transporte e biometria (Figura 9) podem resultar em imunossupressão, injúrias físicas e até mesmo em morte dos peixes. Com o propósito de otimizar o manejo sem que fatores de estresse e danos à integridade física dos peixes ocorram, o uso de anestésicos tem se tornado uma prática de rotina em situações e procedimentos em que a manipulação direta dos animais é necessária.

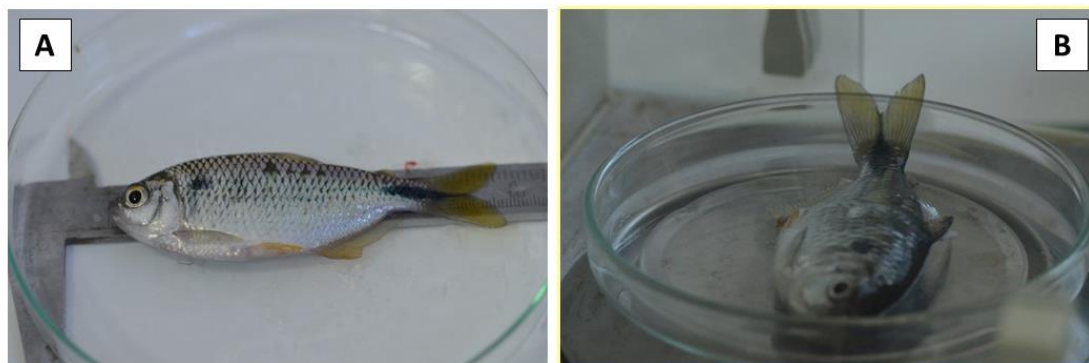


Figura 9. Biometria do lambari do rabo amarelo *Astyanax altiparanae*: (a) Mensuração; (b) Pesagem. Fotos: Antonio Ostrensky (a); Thayzi Zeni (b).

Entre alguns dos produtos sintéticos mais comuns utilizados na anestesia de peixes estão o MS-222 (tricaína metanosulfonato) e o propofol (2,6-diisopropilfenol). O MS-222, é o anestésico mais utilizado em todo mundo e o único com uso autorizado pela agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*). Já o propofol é o anestésico mais utilizado em animais de uma forma geral e tem sido utilizado cada vez com maior frequência em peixes. Mas, além do alto custo, os anestésicos sintéticos possuem venda controlada, são geralmente difíceis de serem encontrados no mercado e ainda podem ter restrições legais de uso.

Produtos naturais, derivados de plantas como os óleos essenciais de cravo *Syzygium aromaticum* e de menta *Mentha arvensis* também são comumente utilizados como anestésicos para peixes e caracterizam-se como uma alternativa altamente viável e prática aos anestésicos sintéticos. O óleo de cânfora *Cinnamomum camphora*, ainda é pouco utilizado como anestésico e são raros registros do uso deste produto na anestesia de peixes ou outros organismos aquáticos.

A anestesia em peixes geralmente é realizada por imersão, ou seja, o composto anestésico é adicionado na água. Os animais passam então por uma sequência de estágios anestésicos (Tabela 16) que estão associados a mudanças comportamentais, iniciando-se com a perda de reação a estímulos externos até a redução parcial ou total dos movimentos operculares, conforme descrito na Figura 10.

Tabela 16. Estágios de indução anestésica em peixes.

Estágio anestésico	Parâmetros comportamentais
1 – Sedação	Perda de reação a estímulos externos.
2 – Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio.
3 – Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio.
4 – Anestesia cirúrgica	Redução dos movimentos operculares.
5 – Colapso medular	Ausência de movimentos operculares.

Fonte: Adaptado de Ross & Ross (2008).

O estágio anestésico normalmente mais indicado para se fazer manejo de atividades como a reprodução induzida ou até mesmo cirurgias em peixes é o de anestesia cirúrgica (estágio IV). Já para manejo de longo prazo, como o que acontece durante o transporte de peixes, o mais indicado seria o de anestesia leve estágio II), em que os peixes irão apresentar apenas redução no metabolismo, evitando assim que se acumulem uns sobre os outros no fundo da embalagem, ou mesmo de anestesia profunda (estágio III), em algumas situações.

É recomendável que o tempo para se atingir estes estágios deve ser de um a três minutos e a recuperação da anestesia (após os animais serem transferidos para uma água limpa, sem anestésicos) de até cinco minutos. Porém, fatores como o tipo do anestésico, tempo de exposição, o tamanho dos peixes e a espécie que está sendo utilizada podem influenciar nessas condições.

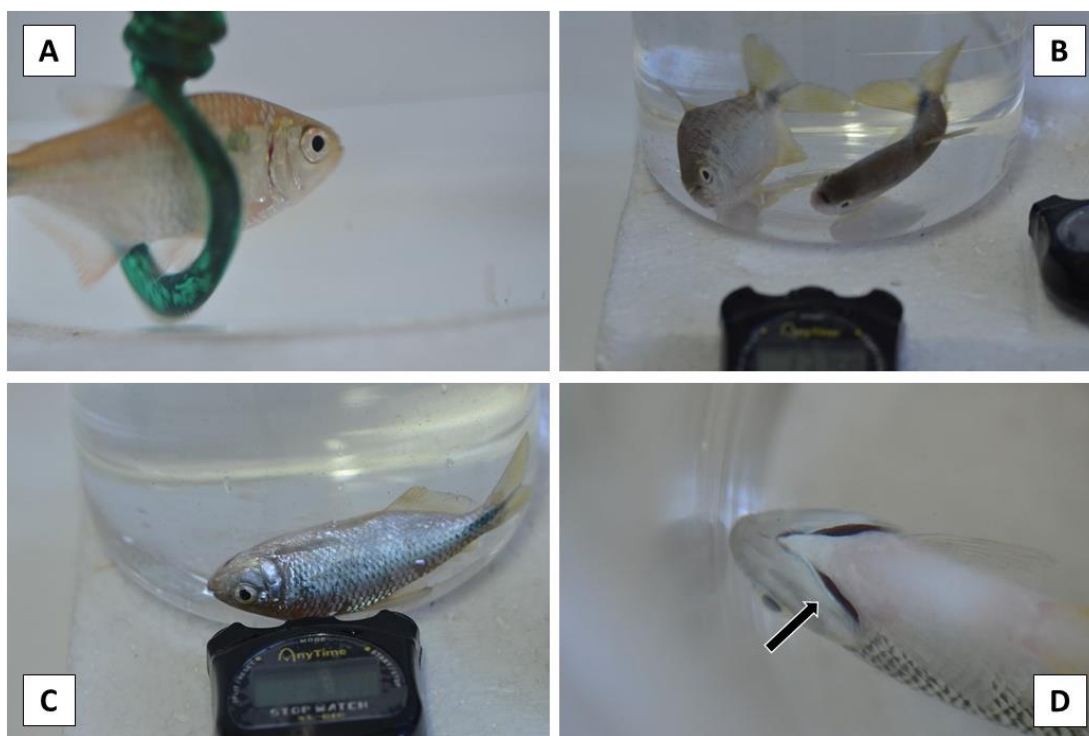


Figura 10. Estágios anestésicos em exemplares de *A. altiparanae*: (a) perda de reação a estímulos externos; (b) perda parcial de equilíbrio; (c) perda total de equilíbrio; (d) redução de batimentos operculares. Nota: Opérculos fechados (seta). Fotos: Antonio Ostrensky.

Estudos realizados no Laboratório de Pesquisa em Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), na Universidade Federal do Paraná (UFPR), avaliaram o desempenho de cinco diferentes tipos de anestésicos para o lambari do rabo amarelo. Os resultados obtidos permitiram que se identificassem as concentrações ideais de cada um dos dois anestésicos sintéticos e dos três anestésicos naturais estudados. Além de cada produto apresentar uma concentração específica os resultados mostraram que há diferença entre os tempos necessários para a indução ao estágio cirúrgico e para a recuperação de indivíduos de diferentes classes de tamanho (Tabela 17).

O MS-222 proporcionou tempos de resposta à indução ao estágio de anestesia cirúrgica 5,6 a 26,0% menores que os proporcionados pelo propofol. Já em relação ao tempo de recuperação anestésica essa diferença foi ainda maior, variando de 27,2 a 49,2%, dependendo da classe de tamanho dos animais utilizados. Essa é uma evidente vantagem do MS-222 em relação ao

propofol, especialmente nos casos em que há necessidade de maior rapidez durante o manejo.

Entre os óleos essenciais, o óleo de menta apresentou os melhores tempos de indução anestésica, em especial para os peixes menores. Porém, os tempos ainda foram superiores aos geralmente recomendados. Já os tempos de recuperação do óleo de cravo e cânfora, também para as classes de peixes menores, foram os que mais se adequaram aos padrões considerados ideais (aproximadamente 300 s). Desta forma, sugere-se que o óleo de menta seja utilizado em casos em que há a necessidade de rápida indução anestésica dos peixes, como em procedimentos como biometria. Havendo a necessidade dos peixes permanecerem anestesiados por períodos maiores, os óleos de cravo e cânfora são os mais recomendados, em especial também pela rápida recuperação proporcionada por estes produtos.

Tabela 17. Concentrações ideais e tempos (s) esperados (medianas  $\pm$  50%) de indução e recuperação anestésicas das classes de tamanho I, II e III de *Astyanax altiparanae* submetidos aos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora e aos anestésicos sintéticos MS-222 e propofol.

Anestésico	Classe de Tamanho	[ ]	Tempo esperado de indução (s)	Tempo esperado de recuperação (s)
Cravo*	I (1,5 - 5 cm)	35	449,5 (404-566)	281 (234-583)
	II (5,1 - 8,0 cm)	35	683 (583-752)	234 (206-276)
	III (> 8,1 cm)	35	425 (373-494)	447 (381-520)
Menta*	I (1,5 - 5 cm)	50	396 (306,5-504,5)	647 (550-737)
	II (5,1 - 8,0 cm)	130	383 (313-475)	654 (556-708)
	III (> 8,1 cm)	140	515 (494-535)	380,5 (305-485)
Cânfora*	I (1,5 - 5 cm)	300	608 (490,5-638,5)	166 (146-199)
	II (5,1 - 8,0 cm)	600	471 (448-582)	293 (227-383)
	III (> 8,1 cm)	600	341,5 (275,5-383)	554 (395-616)
MS-222**	I (1,5 - 5 cm)	90	476 (454-514)	320 (311-394)
	II (5,1 - 8,0 cm)	90	469 (443-521)	313 (243-325)
	III (> 8,1 cm)	90	545,5 (403-611)	413,5 (405,5-460)
Propofol**	I (1,5 - 5 cm)	0,22	508 (434-620,5)	523 (490-566)

Anestésico	Classe de Tamanho	[ ]	Tempo esperado de indução (s)	Tempo esperado de recuperação (s)
	II (5,1 - 8,0 cm)	0,23	497 (452-653)	617 (501-877)
	III (> 8,1 cm)	0,27	737 (710-767)	568 (485-605)

\* Concentrações em  $\mu\text{L L}^{-1}$  \*\* Concentrações em  $\text{mg L}^{-1}$

Todos os compostos avaliados proporcionaram efeitos anestésicos em lambaris do rabo amarelo. Assim, a escolha do anestésico a ser utilizado deve considerar, além dos tempos necessários para indução e recuperação anestésicas, critérios como o custo do produto, a sua eficácia para a situação em que ele será utilizado, a sua disponibilidade no mercado, a facilidade de obtenção, a segurança durante a utilização e os possíveis efeitos colaterais que estes produtos podem causar aos peixes, ao manipulador e também ao meio ambiente, conforme descrito na Tabela 18.

Tabela 18. Síntese do uso dos óleos essenciais de cravo, menta e cânfora e dos anestésicos sintéticos MS-222 e propofol na indução anestésica de lambaris (*Astyanax altiparanae*) das classes de tamanho I, (indivíduos entre 1,5 e 5,0 cm), II (entre 5,1 e 8,0 cm) e III (maiores que 8,1 cm).

Anestésico (unidade)	Classe - Concentração	Característica do produto	Desempenho
Cravo ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	I - 35 II - 35 III - 35	Fácil aquisição; manipulação segura; baixo custo	Rápida indução e recuperação
Menta ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	I - 50 II - 130 III - 140	Fácil aquisição; manipulação segura; baixo custo	Lenta recuperação
Cânfora ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	I - 300 II - 600 III - 600	Fácil aquisição; manipulação segura e baixo custo	Indução tardia, porém rápida recuperação
MS-222 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	I - 90 II - 90 III - 90	Aquisição restrita; altamente solúvel em água; fácil manipulação; pode causar efeitos colaterais em humanos e peixes, alto custo	Indução tardia, porém rápida recuperação
Propofol ( $\text{mg L}^{-1}$ )	I - 0,22 II - 0,23 III - 0,27	Solúvel em água; aquisição somente com receita assinada por médico-veterinário; baixo custo	Rápida indução e recuperação

