

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Benzocaína e óleo de cravo como anestésicos para
alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*)**

João Morato Fernandes

Pelotas, 2011

BENZOCAÍNA E ÓLEO DE CRAVO COMO ANESTÉSICOS PARA ALEVINOS DE PEIXE-REI (*Odontesthes bonariensis*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Produção Animal).

Orientador: Sérgio Renato Noguez Piedras

Pelotas, 2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras (Presidente – UFPel)

Prof. Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey (UFPel)

Prof. Dr. Paulo Rodinei Soares Lopes (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Víctor Fernando Büttow Roll (UFPel)

Dedico

Ao meu filho

Se formas de vida surgiram em outro lugar do universo, elas não parecem se assemelhar com aquelas da Terra, a menos que sua origem extraterrestre seja também um lugar onde haja uma riqueza de água líquida disponível.

David Nelson & Michael Cox

LEHNINGER. Princípios de Bioquímica

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras pela amizade, compreensão e dedicação que culminaram com a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey pela idealização do Laboratório de Ictiologia, que me foi colocado a disposição para realização de meus experimentos, assim como colaboração com minhas atividades.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Prof. PhD. Eduardo Gonçalves Xavier e Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll pelo grande interesse demonstrado com a evolução deste programa de pós-graduação, como também pelo profissionalismo com executaram e executam suas tarefas.

Aos membros do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela idoneidade e respeito com que tratam as situações apresentadas, tentando sempre encontrar a melhor solução possível.

Aos chefes do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, Prof. Dr. Nelson Laurino Dionelo, Prof^a Dra. Isabella Dias Barbosa Silveira e Prof. PhD. Eduardo Gonçalves Xavier, pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

Aos representantes dos discentes no Colegiado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Cássio Brauner, Fernanda Medeiros Gonçalves, Julcemar Kesller, Leonardo Menezes, Mônica Daiana de Paula Peters e Rafael Aldrighi Tavares pelo empenho no atendimento de nossas reivindicações.

Aos ministrantes das disciplinas que cursei Prof. Dr. Fernando Rutz, Prof. Dr. Ricardo Cardelino, Prof. Dr. Jerri Zanusso, Prof. Dr. Victor Fernando Büttow Roll, Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras, Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino e Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato pelo aprofundamento de conhecimentos já iniciados e aquisição de novos.

Aos colegas do Laboratório de Ictiologia, Cleber Bastos Rocha, Mauro Kaster Portelinha, Aline Conceição Pfaff de Britto, Jackes Douglas Manke dos Santos e Rafael Aldrighi Tavares, aos funcionários Róger Marlon Esteves e Paulo Ricardo, e aos estudantes de graduação Marcos Dinael Schellin Einhardt, Anna

Carolina Miranda Cavaleiro, Cristiano Thurrow, Daiane Machado Souza, Fabiana Vellar de Lima e Juliana da Rocha Foster pelo companheirismo nas execuções de minhas atividades.

Aos demais colegas de mestrado e doutorado pelo prazer da sua convivência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Robaldo por sua colaboração nas discussões de idéias para elaboração de projetos e técnicas em piscicultura.

Às secretárias do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, Carolina e Norma pela atenção que sempre me foi dispensada.

Aos secretários do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Mara, Renata, Leteliê e Graziela pela boa vontade em auxiliar os alunos de pós-graduação.

Especialmente ao Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras e aos colegas Rafael Aldrighi Tavares e Jackes Douglas Manke dos Santos pela inestimável ajuda na elaboração e formatação desta dissertação.

E, se ainda sobrou lugar para agradecer a mais alguém, agradeço, novamente ao Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras, desta vez, por tudo.

Resumo

MORATO-FERNANDES, João. **Benzocaína e óleo de cravo como anestésicos para alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*)**. 2011. 38f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina onde tem grande importância econômica para a pesca artesanal. Esta espécie é de grande interesse para a aquicultura e, apesar disso, os estudos relacionados às suas técnicas de manejo são raros. Uma dificuldade da pesquisa em laboratório com peixe-rei está relacionada à sua sensibilidade, pois apresenta níveis basais de cortisol mais elevados que outras espécies de água doce. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a eficiência da benzocaína e do óleo de cravo como anestésico para alevinos de peixe-rei. Para tal foram realizados dois experimentos onde alevinos com comprimento total médio de $57 \pm 7,08$ mm e peso médio de $1,1 \pm 0,44$ g foram expostos a concentração entre 40 mg/l a 120 mg/l de benzocaína e 12 mg/l a 75 mg/l de óleo de cravo. Foram avaliados a sobrevivência, o tempo de anestesia e o tempo de recuperação para cada um dos fármacos. Foi analisada a correlação entre a concentração de cada produto e o tempo de indução anestésica. Também foi analisada a correlação entre a concentração de cada produto e o tempo de recuperação. Ambos os fármacos, benzocaína e óleo de cravo, mostraram eficiência para anestésicar peixe-rei, com correlação negativa entre a dose e o tempo de indução de anestesia. Para benzocaína as concentrações entre 80 mg/l e 100 mg/l mostraram melhor resultado, enquanto para óleo de cravo as melhores concentrações ficaram entre 25 mg/l e 50 mg/l. Por outro lado, o tempo de recuperação do estado de anestesia não apresentou variação significativa nas diferentes concentrações dos produtos testados. Esses resultados mostram que o peixe-rei tem elevada capacidade de metabolização dos produtos testados.

Palavras-chave: Anestesia. Sobrevivência. Indução. Recuperação. Aquicultura.

Abstract

MORATO-FERNANDES, João. **Benzocaine and clove oil as anesthetics for pejerrey fingerlings (*Odontesthes bonariensis*)**. 2011. 38f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) is a native species from Rio Grande do Sul, Uruguay and Argentina, where it has great economic importance for artisanal fishing. This species is of great interest for aquaculture however, the studies related to its handling technique are rare. One difficulty in laboratory research with pejerrey is related to its sensitivity, as it presents higher basal cortisol levels than other freshwater species. For this reason, the aim of this work was to evaluate the efficiency of benzocaine and clove oil as anesthetics for pejerrey fingerlings. For which two experiments were made where fingerlings with average total length 57 ± 7.8 mm and average weight 1.1 ± 0.44 g were exposed to benzocaine with concentration between 40 mg/l and 120 mg/l and to clove oil with concentration between 12 mg/l and 75 mg/l. Survival, anesthesia induction time and recovery time for each one of the pharmaceuticals were evaluated. The correlation between the concentration for each product and the anesthesia induction time was analyzed. Also, the correlation between the each product and the recovery time was analyzed. Both benzocaine and clove oil pharmaceuticals showed efficiency as anesthetics for pejerrey fingerlings, with negative correlation between the dose of anesthetics and the anesthesia induction time. For benzocaine, the concentrations between 80 mg/l and 100 mg/l showed better result, as for clove oil the optimal concentrations were between 25 mg/l and 50 mg/l. On the other hand, the anesthesia recovery time did not present significant variation on the different concentrations of the tested products. These results show that the tested products are highly metabolizable by pejerrey.

Keywords: Anesthesia. Survival. Induction. Recovery. Aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre a dosagem de benzocaína (mg/l) e o tempo de indução de anestesia para alevinos de peixe-rei (<i>Odontesthes bonariensis</i>).	28
Figura 2 – Relação entre a dosagem de óleo de cravo (mg/l) e o tempo de indução de anestesia para alevinos de peixe-rei (<i>Odontesthes bonariensis</i>)..	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estágios da anestesia e da recuperação sugeridos por Iwama et al. (1989).	20
Tabela 2 – Estágios de anestesia sugeridos por Storkopf (1993).	20
Tabela 3 – Estágios de anestesia sugeridos por Bowser (2001).	21
Tabela 4 – Estágios de anestesia e recuperação sugeridos por Ross & Ross (1999; 2008).	22
Tabela 5 – Tempo de recuperação (segundos) do estado de anestesia e mortalidade (%) de alevinos de peixe-rei (<i>Odontesthes bonariensis</i>) submetidos à benzocaina e ao óleo de cravo.	30

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Características gerais do peixe-rei	14
2.2	Estresse em peixes	15
2.3	Uso de anestésicos em peixes	16
2.4	Características de um bom anestésico para peixes	18
2.5	Estágios de anestesia em peixes	19
2.6	Benzocaína como anestésico de peixes	22
2.7	O Óleo de Cravo (Eugenol) como anestésico de peixes	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.	CONCLUSÕES	32
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura gaúcha no ano de 2000 produziu 21 mil toneladas de peixes de água doce, o que representou 15% das 140 mil toneladas da produção aquícola brasileira (QUEIROZ et al., 2002). Já em 2005, quando a piscicultura no Brasil produziu 178 mil toneladas, o Rio Grande do Sul produziu 23,3 mil toneladas de peixes em água interiores, o que representou 13% do total brasileiro (IBAMA, 2007). Estes dados mostram a situação de estagnação da piscicultura gaúcha e foi registrado por Baldisserotto (2009), em uma profunda discussão sobre o estado de desenvolvimento da piscicultura do estado, onde o autor destaca a problemática das espécies exóticas e suas questões legais e, recomenda como alternativa, estudos sobre as espécies locais para a reestruturação da piscicultura do Rio Grande do Sul.

O uso de espécies nativas na piscicultura apresenta uma série de vantagens, principalmente, pelo fato de não apresentarem restrições ambientais, estarem adaptadas ao clima do estado e por já apresentarem um mercado consumidor. Das inúmeras espécies nativas (traíra, jundiá, peixe-rei, lambari, pintado, viola, cascuda, grumatã, piava e cará) do Rio Grande do Sul com potencial para piscicultura, as mais estudadas são o jundiá (*Rhamdia quelen*) e o peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) (BALDISSEROTTO, 2009).

O peixe-rei tem sido objeto de estudos relacionados à sua reprodução e bioecologia, apesar disso, são raros os estudos relacionados a técnicas de manejo, sendo que uma dificuldade da pesquisa em laboratório com peixe-rei está relacionada à sua sensibilidade, pois apresenta níveis basais de cortisol mais elevados que outras espécies de água doce (TSUZUKI et al., 2001).

A manipulação dos peixes durante os procedimentos de biometria,

classificação, transporte, reprodução artificial entre outros, causam aumento dos níveis de estresse que resultam em injúrias e depleção imunológica que podem levar a redução de crescimento, infecções e até a morte. Moreira e Volpato (2004) afirmam que o estresse é um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de doenças e mortalidade em aquicultura e que nos peixes, a recuperação mnemônica de experiências estressoras induz aumento dos níveis plasmáticos de cortisol.

Em contrapartida, Galhardo e Oliveira (2006) afirmam que situações de estresse nos peixes, podem ser revertidas, aumentando a resposta ao medo, mediante a administração de analgésicos. Por outro lado, a Lei Federal N° 11.794, de 2008 que determina a manutenção de um cadastro nacional das Comissões de Ética de Uso de Animais (CEUAs) institucionais (BRASIL, 2008), criou maior rigor quanto à condução da pesquisa científica com animais, fazendo com que sejam obedecidas normas de manejo, que por sua vez não são conhecidas para muitas espécies.

Neste sentido este trabalho teve por objetivo avaliar dois anestésicos, que possibilite o manejo adequado de alevinos de *Odontesthes bonariensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais do peixe-rei

A primeira descrição da espécie deve-se a Cuvier e Valenciennes (1835), com a designação de *Atherina bonariensis*, que, posteriormente, foi enquadrada no gênero *Odontesthes* (DE BUEN, 1953). O peixe-rei (*O. bonariensis*) pertence à família Atherinopsidae cuja ocorrência é citada para zonas tropical e temperada, em águas marinhas, estuarinas e doces dos cinco continentes.

Os peixes-rei são de tamanho pequeno a médio, são nadadores velozes, são ágeis e, apresentam uma faixa lateral prateada característica ao longo do corpo, que lhe confere o nome vulgar, no idioma inglês, de “silverside”. Apresentam carne clara e saborosa, muito apreciada pelo consumidor. No período de 2003 a 2005, segundo dados do IBAMA(2005), foram capturadas, pela pesca artesanal 59 toneladas de peixe-rei na bacia hidrográfica da Lagoa Mirim, que corresponde a 2,34% do total capturado (MORATO-FERNANDES et al., 2009).

No Rio Grande do Sul, a Atherinicultura, que é o ramo da piscicultura destinado à criação de espécies da família Atherinopsidae, teve início na década de 1940, com estudos de biologia e reprodução do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*), na Lagoa dos Quadros (KLEEREKOPER, 1945). A Atherinicultura difundiu-se na América do Sul e em diversos países de outros continentes, como Japão, França, Itália e Israel, entre outros (BONETTO e CASTELLO, 1985).

Sendo a família Atherinopsidae de origem marinha, a provável origem das espécies de peixe-rei encontradas nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, desde a Lagoa de Itapeva, na região norte, até as Lagoas: Mirim e Mangueira no sul, foi a sua capacidade de invadir e colonizar ambientes estuarinos e límnicos. Segundo Evermann e Kendall (1906), as espécies do gênero *Odontesthes* são

restritas ao extremo sul da América do Sul, e, ocorrem em ambientes dulceaquícolas, estuarinos ou marinhos (BEMVENUTI, 1995).

Vários estudos relacionados a bioecologia desta espécie foram objeto de diversos autores, dentre os quais destacam-se: Strussmann (1989), Strussmann et al. (1996) Sampaio et al. (1996), Piedras (1999), Piedras e Pouey (2000), Miranda et al. (2006), Tzusuki et al. (2000; 2001; 2007), Piedras et al. (2009).

2.2 Estresse em peixes

De acordo com Barton (2002), estresse é tido como um impacto negativo e, geralmente associado a um sistema que é agredido ou fatigado, que produz uma resposta celular ou orgânica, a qualquer demanda, que resulte uma alteração do estado fisiológico além do estado de repouso normal. Para Iwama et al. (2004) esta é uma resposta vital, normal de todos os organismos vivos, que vão desde a indução de determinados genes e proteínas para uma resposta comportamental, de maneira que a resposta ao estresse permite evitar ou lidar com os desafios para a homeostasia.

Os peixes em situação de estresse produzem resposta fisiológica similar à verificada em outros vertebrados (GALHARDO e OLIVEIRA, 2006), sendo que a resposta aos estressores pode ser classificada em adaptativa, que permite recuperação da homeostasia, e, inadequadas que podem comprometer o desempenho ou levar o animal a exaustão e a morte (BARTON, 2002).

Um dos sinais imediatos de um estado de estresse nos peixes é uma resposta comportamental. Atividades como a aquisição de alimentos, evitarem predadores, captura de presas e migração são essenciais para a sobrevivência do organismo e comumente utilizados como indicadores de estressores ambientais (LITTLE, 2002). Alterações de tais comportamentos podem levar alguns minutos ou semanas para retornar às condições pré-tensão, dependendo da natureza e magnitude do estressor. Comportamentos que são mais importantes para a sobrevivência do organismo, tendem a voltar à normalidade em tempo menor, diminuindo a magnitude potencial do estressor e, aumentando as chances de sobrevivência para o indivíduo. No entanto, se a mitigação do estresse não for possível, as alterações induzidas no comportamento podem

então resultar em conseqüências deletérias na forma como o animal responde ao seu ambiente (SCHRECK et al., 1997).

Respostas comportamentais e fisiológicas estão intimamente relacionadas. Assim uma resposta adaptativa ao estresse diminui a demanda energética dos sistemas fisiológicos, por outro lado a resposta fisiológica, serve para manter equilibrada a resposta comportamental. Estresse causado por altas densidades ou manipulação, causa nos peixes uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas na tentativa de compensar o desafio que lhes é imposto. A resposta ao estresse em peixes tem sido amplamente classificada em primária, secundária e terciária (GAMPERL et al., 1994).

A resposta primária representa a percepção de uma alteração da condição ambiental e inicia uma resposta neuroendócrina que faz parte do esforço generalizado para manutenção da homeostasia. Esta resposta inclui a rápida liberação de hormônios do estresse, catecolaminas e cortisol, a partir dos centros cerebrais.

Já, a resposta secundária se caracteriza pela liberação destes hormônios para o sistema circulatório e tecidos; resultando em vários efeitos fisiológicos e bioquímicos, como aumento dos batimentos cardíacos, aumento da demanda de oxigênio, mobilização de energia e alterações no balanço hidromineral. Barton (2002) sugere a medição da concentração de glicose no plasma como um indicador de resposta secundário ao estresse em peixes.

Na resposta terciária os níveis de estresse se refletem em toda a população, e é resultado da incapacidade dos indivíduos em adaptar-se ao agente estressor, tendo como conseqüências perdas energéticas que são desviadas dos processos vitais, inibindo crescimento, reprodução e causando depressão imune.

2.3 Uso de anestésicos em peixes

Anestesia é definida como uma perda de sensação resultante da depressão do sistema nervoso central, causada pela aplicação de um agente externo. No caso específico de peixes, compromete a postura normal e a capacidade de nado na coluna de água. O uso de anestésicos em peixes facilita o

trabalho de investigação e é necessário para estudos tais como biometria, seleção, avaliação de doenças, reprodução artificial, transporte e cirurgias para investigações fisiológicas, onde os peixes devem ser mantidos imóveis por longos períodos de tempo (IWAMA et al., 1994).

Bowser (2001) recomenda que para cada espécie devam ser estudados os seus limites de tolerância aos fármacos, e sugere que peixes sejam anestesiados através de banho de imersão, devendo o anestésico ser dissolvido em água, ou diluídos primeiramente em um solvente orgânico. Assim o anestésico, é absorvido através das brânquias, chegando ao sistema circulatório e bloqueando algumas ações reflexas.

Não existindo legislação regulamentando o uso de anestésicos para peixes no Brasil, durante muitos anos a pesquisa baseou-se nas recomendações da Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, onde a Tricaína metanossulfatada (MS-222) é o único anestésico químico recomendado (FAÇANHA e GOMES, 2005). Este produto é um pó branco, cristalino e hidrossolúvel, que em solução acidifica o meio, podendo causar efeitos colaterais danosos aos peixes. Por isto faz-se necessário a utilização de bicarbonato de sódio, como solução tampão (BOWSER, 2001).

A dificuldade de obtenção e preços elevados do MS-222, e a necessidade do uso de produtos menos persistentes, levou a busca por técnicas alternativas como eletricidade, gás carbônico e hipotermia, métodos estes que necessitam ainda de estudos, e não estão acessíveis aos produtores. Neste contexto, no final de década de 1970 e início dos anos 1980 começaram os estudos buscando desenvolver técnicas de anestesia para peixes com produtos alternativos, como a benzocaína (FERRIERA et al., 1979), lidocaína (CARRASCO, et al. 1984) entre outros.

Atualmente os produtos mais utilizados no mundo como anestésicos para peixes são o MS-222, a quinaldina, o 2-fenoxietanol, a benzocaína e óleo de cravo (OKAMOTO et al., 2009), sendo que no Brasil predomina o uso dos dois últimos (SIMÕES e GOMES, 2009).

A quinaldina é um líquido oleoso, amarelado, de odor desagradável e de baixa solubilidade em água, necessitando ser dissolvido em álcool ou acetona e

ser tamponado. Este produto é de baixo custo, mas apresenta as desvantagens de ser irritante aos peixes e carcinogênico (COYLE et al., 2004).

O 2-fenoxietanol é um líquido oleoso, opaco, moderadamente solúvel em água, mas muito solúvel em etanol. É relativamente barato, apresenta boa margem de segurança e, por ser bactericida e fungicida, é usado em cirurgia (COYLE et al., 2004) .

2.4 Características de um bom anestésico para peixes

Um bom anestésico para peixes é aquele que além de proporcionar o estado de anestesia desejado, não cause danos biológicos no animal anestesiado, ou seja, não deve causar morte, afetar a reprodução ou crescimento. Também não deve deixar resíduos na carne e não promover alterações celulares (RUOBACH e GOMES, 2001), além de ser de fácil acesso, baixo custo e não causar danos ao operador.

A escolha do tipo de anestesia é de fácil definição, mas o tempo adequado ou circunstância para usá-la é menos clara, por ser muito específica, sendo, portanto necessários estudos para a espécie de interesse (GRAHAM e IWAMA, 1990).

Muitos dos anestésicos utilizados em peixes são semelhantes aos utilizados em pesquisas de mamíferos ou mesmo em seres humanos. Sendo que a maioria destes é considerada anestésicos tópicos em mamíferos. A especificidade dos anestésicos em peixes deve ser considerada como determinante para o seu uso sistemático, tendo em vista que diferentes fármacos podem proporcionar diferentes respostas, conforme a espécie de interesse. Para Iwama et al. (2004) um anestésico deve induzir a anestesia em menos de 3 minutos de exposição e, a recuperação deve ocorrer dentro de 5 minutos após a colocação dos peixes em água limpa. De acordo com Roubach e Gomes (2001) o tempo máximo de anestesia não deve ultrapassar 10 minutos, pois tempos de indução anestésica superiores têm recuperação duvidosa.

Molinero e Gonzalez (1995) afirmam que a cessação da respiração por longos períodos reduz o oxigênio no sangue, resultando acidose respiratória pelo aumento do gás carbônico, o que, por sua vez faz com que ocorra aumento das

concentrações sanguíneas de adrenalina e cortisol, que resultam em nova situação de estresse e até a morte dos animais. Neste mesmo sentido, Inoue et al. (2003) afirmam que alguns anestésicos podem resultar danos nos olhos, irritação nas brânquias e perda de muco, com a consequente redução da proteção contra patógenos oportunistas, resultando um outro tipo estresse. Bowser (2001) recomenda que anestésicos não devam ser usados dentro de 21 dias da despesca para o consumo, o que foi confirmado por Simões & Gomes (2009).

Tendo em vista que a maioria dos anestésicos utilizados em peixes é diluída em água, onde os animais são imersos para a anestesia, deve-se considerar que a ação dos fármacos podem ser afetadas pelas características da água, como temperatura, pH e alcalinidade, bem como podem alterar as características da água, como a formação de espuma, que pode reduzir a transferência de gás para dentro e fora da água. De acordo com o objetivo da anestesia (transporte, biometria, reprodução, cirurgia, etc.) podem ser usados diferentes anestésicos e diferentes dosagens (ACKERMAN et al., 2010).

2.5 Estágios de anestesia em peixes

A exposição dos animais aos diversos fármacos anestésicos utilizados, causam diferentes respostas de acordo com a espécie em estudo, tamanho do animal, condições ambientais (temperatura, pH, alcalinidade) e dosagens utilizadas. Estas respostas, normalmente, obedecem a uma sequência progressiva de comportamentos, em que o animal partindo de sua condição normal, com movimentos natatórios e respostas visuais autônomas, chega após um período de tempo de exposição ao anestésico, a uma condição de prostração sem capacidade de reação a qualquer estímulo (MARKING E MEYER, 1985).

Com a proposta de padronizar estas respostas, vários autores sugerem diferentes escalas ou estágios de anestesia, relacionados às respostas comportamentais dos peixes expostos a um anestésico. Os primeiros estudos sobre efeitos e respostas fisiológicas de peixes a anestésicos são descritos por McFarland (1959), Ferriera et al. (1979) e Barton & Helfrich (1981).

Iwama et al. (1989) descrevem as respostas comportamentais dos peixes (Tabela 1) comparando o comportamento dos peixes em estágios de um a três, durante o processo de evolução da anestesia e da recuperação dos peixes, sendo a proposta dos autores de oferecer informações básicas nos procedimentos que necessitam de curtos períodos de sedação, como procedimentos biométricos ou de reprodução.

Tabela 1 - Estágios da anestesia e da recuperação sugeridos por Iwama et al. (1989).

Estágio	Anestesia	Recuperação
I	Perda de equilíbrio	Corpo imóvel. Retornam os movimentos operculares
II	Perda de movimento, mas com movimentos operculares	Movimentos operculares regulares, início de movimento corporal
III	Deposição no fundo do aquário com cessação dos movimentos operculares	Recuperação do equilíbrio e natação e aparência pré-anestésica

Entretanto, Storkopf (1993) tem a preocupação em descrever as respostas dos peixes anestesiados mais detalhadamente, em seis estágios de anestesia (Tabela 2) e uma fase de recuperação.

Tabela 2 – Estágios de anestesia sugeridos por Storkopf (1993).

Estágio	Características comportamentais
1. Sedação leve	Perda de reação a movimentos visuais e ao toque
2. Anestesia leve	Perda parcial do equilíbrio
3. Anestesia profunda	Perda total do equilíbrio
4. Anestesia cirúrgica I	Diminuição dos movimentos operculares
5. Anestesia cirúrgica II	Mínimo movimento opercular, o peixe fica estático
6. Colapso medular	Overdose ou tempo excessivo de anestesia
Recuperação	Recuperação do equilíbrio e natação normal

Bowser (2001) revela preocupação com a evolução das respostas ao anestésico em sete etapas (Tabela 3), desde o estágio zero, que seria o animal em condição normal, até o estágio seis, em que ocorre o colapso medular e o processo de recuperação se torna irreversível, levando o animal à morte.

Tabela 3 – Estágios de anestesia sugeridos por Bowser (2001).

Estágio	Estado do animal	Resposta comportamental do peixe
0	Normal	Reação a estímulos externos, movimentos operculares normais.
1	Sedação leve	Ligeira perda de reatividade a estímulos externos; movimentos operculares ligeiramente diminuídos; equilíbrio normal.
2	Sedação profunda	Perda total da reatividade a todos os estímulos externos; ligeira queda na taxa de opercular; equilíbrio normal.
3	Perda parcial do equilíbrio	Perda parcial do tônus muscular; natação errática, maior taxa opercular; reatividade apenas a fortes estímulos táteis e vibratórios.
4	Perda total de equilíbrio	Total perda de tônus muscular e do equilíbrio; movimentos operculares lentos, mas regulares; perda dos reflexos espinhais.
5	Perda da reatividade reflexa	Perda total da reatividade; movimentos operculares lentos e irregulares; ritmo do coração muito lento; perda de todos os reflexos
6	Colapso medular (fase da asfixia)	Cessam os movimentos operculares; geralmente, segue-se uma rápida parada cardíaca.

Ross e Ross (1999; 2008) descrevem as respostas dos peixes aos anestésicos em quatro estágios de indução à anestesia e quatro estágios de recuperação do processo de anestesia (Tabela 4).

Tabela 4 – Estágios de anestesia e recuperação sugeridos por Ross & Ross (1999; 2008).

Estágios de Indução	Comportamentos observados
Pré - indução	Movimentos operculares e natação normal.
1	Aumento pronunciado dos movimentos de natação de um lado para outro, sem perda de equilíbrio.
2	Perda parcial de equilíbrio e natação errática.
3	Anestesia profunda: perda total do equilíbrio, ausência de movimentos das nadadeiras e de natação, movimentos operculares reduzidos e respostas aos estímulos táteis intensos.
4	Anestesia cirúrgica: movimentos operculares lentos e irregulares, perda total de reação a estímulos táteis.
Estágios de Recuperação	Comportamentos observados
1	Aumento dos movimentos operculares e início de movimentação das nadadeiras.
2	Início da natação errática sem estabelecimento de equilíbrio.
3	Recuperação parcial do equilíbrio e dos movimentos de natação.
4	Recuperação total do equilíbrio e dos movimentos operculares e de natação.

2.6 Benzocaína como anestésico de peixes

A benzocaína é o p-aminobenzoato de etilo, um éster etílico do ácido p-aminobenzóico (PABA). É um anestésico local, usado como calmante para dores em mamíferos. Atua bloqueando a condução de impulsos nervosos e diminuindo a permeabilidade da membrana neuronal ao iodeto de sódio. É absorvido de forma rápida através das mucosas (LABSYNTH, 2010). É comercializada na forma de sal cristalino, que por ser hidrofóbico, deve ser dissolvido em álcool etílico, antes de ser diluído na água (GIMBO et al., 2008).

A solução padrão de benzocaína, diluída em álcool etílico ou acetona, pode ser armazenada por mais de um ano, em frasco escuro, sem alterar suas

características anestésicas (COYLE et al., 2004). Estes pesquisadores também afirmam que essa solução não altera a dureza e o pH da água.

A benzocaína, assim como a maioria dos anestésicos utilizados em peixes, causa depressão dos centros medulares respiratórios, que por sua vez, reduzem o fluxo sanguíneo e a ventilação branquial, levando o animal a hipóxia e perda dos sentidos (ARIAS, 1999). De acordo com Ackerman et al. (2010) peixes anestesiados com benzocaína podem manter algumas funções locomotora em todas as fases da anestesia, tornando este um anestésico inadequado para uso em processos que envolvem a cirurgia. Já, as doses letais são dependentes da temperatura da água, e as margens de segurança (diferença entre as doses letais e eficazes) são mais largas em temperaturas mais baixas (GILDERHUS, 1991).

A benzocaína vem sendo utilizada como anestésico para uma grande variedade de espécies de peixes (GOMES et al., 2001; INOUE et al., 2004; DELBON, 2006; GIMBO et al., 2008 e OKAMOTO et al., 2009) com dosagens variando de 25 mg/l a 100 mg/l e tempo de indução a anestesia de até 4 minutos e recuperação até 10 minutos (GILDERHUS, 1991). Seu uso não se reflete no crescimento e reprodução dos peixes (ROSS & ROSS, 1999).

2.7 O Óleo de Cravo (Eugenol) como anestésico de peixes

Derivado de flores, folhas, brotos de *Eugenia aromaticum*, o óleo de cravo, é de uso odontológico como antiviral e anestésico (KEENE et al. 1998) e, mais recentemente, vem sendo utilizado com sucesso como anestésico para manejo e transporte de peixes e camarões (ROSS E ROSS, 2008; OKAMOTO et al., 2009; SAYDMOHAMMED e PAL, 2009). De acordo com Bressler e Ron (2004) o eugenol é metabolizado e excretado rapidamente e completamente eliminado do organismo após 48 horas de exposição. O produto é facilmente encontrado em drogarias de manipulação na forma de concentrado de 70 a 95% do óleo essencial (MAZZAFERA, 2003).

O eugenol (4-alil-2-metoxi-fenol) tem sido usado a concentrações de 25 a 100mg/l, dependendo da espécie de peixe e do grau de anestesia desejado (BOWSER, 2001). Para carpa comum (*Cyprinus carpio*) é usado em concentrações entre 40 e 120mg/l, enquanto que, para truta arco-íris

(*Oncorhynchus mykiss*), de 2 a 5mg/l já é suficiente para causar sedação para transporte. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) doses de 40 a 60mg/l, por 3 a 6 minutos são eficientes para anestesia cirúrgica. As maiores vantagens do óleo de cravo são que ele é barato, não desagradável ao trabalho e possui alta margem de segurança (COYLE et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram conduzidos no laboratório de Ictiologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, durante o mês de março do ano de 2010, sendo utilizados 90 alevinos de *O. bonariensis* com comprimento total médio de $57 \pm 7,08$ mm e $1,1 \pm 0,44$ g de peso médio, retirados aleatoriamente de uma população de 1.000 animais, estocados, separadamente, em caixas de polietileno com capacidade de 1.000 litros. Toda a população foi submetida a um jejum nas 24 horas anteriores ao experimento.

Os fármacos foram adquiridos em farmácia de manipulação veterinária (Vetpharma®), sendo cada um deles diluído previamente em etanol na concentração de 10g/10ml, e após levados a um balão volumétrico, que teve seu volume completado a 1,0 litro com água destilada, sendo este produto, com concentração final de 10mg/ml, a solução estoque usada para o estabelecimento das concentrações desejadas.

Antes da exposição definitiva, foram realizados testes preliminares quando foram testadas concentrações entre 10 e 200mg/l dos produtos, para posterior estabelecimento das concentrações experimentais.

A exposição aos anestésicos foi adaptada de Ross & Ross (1999; 2008) e realizada em recipientes plásticos com capacidade de 2,0 litros de água. Foram realizados dois experimentos, com delineamento experimental completamente ao acaso, onde a unidade experimental foi um indivíduo. No primeiro experimento foram testados cinco tratamentos com benzocaína, nas concentrações de 40; 60; 80; 100 e 120 mg/l, com dez repetições por tratamento. No segundo experimento foram testados quatro tratamentos com óleo de cravo, nas concentrações de 12,5; 25; 50; 75 mg/l, também com dez repetições por tratamento.

Para cada concentração foram expostos 10 animais individualmente e

avaliado o tempo em que cada animal atingia o estágio 3 de anestesia (perda total de equilíbrio) proposto por Ross e Ross (2008). Após atingir o estágio de anestesia desejado, os peixes foram removidos da solução de anestésica, medidos em comprimento e peso e após, colocados em aquários com capacidade de 20 litros, contendo 18 litros de água e aeração constante, para determinar o tempo de recuperação.

O tempo de recuperação do estado de anestesia foi cronometrado desde a remoção do alevino da solução anestésica até sua total recuperação, incluindo o tempo que o exemplar permaneceu fora da água para a realização da biometria, que não foi medido separadamente. O animal foi considerado recuperado quando retomou os movimentos natatórios e equilíbrio, conforme descrito para o estágio 4 por Ross e Ross (2008). Os peixes foram mantidos nos aquários de recuperação por 96 horas para avaliar a mortalidade.

As condições físicas e químicas da água dos recipientes com anestésico e dos aquários de recuperação foram monitoradas, sendo a temperatura e oxigênio dissolvido medidos com Oxímetro YSI-F- 150, o pH com potenciômetro Alfakit e a alcalinidade por titulação (APHA, 1998).

O tempo para atingir o estágio de anestesia dos diferentes produtos e doses testados foi analisado por regressão. Os dados do tempo de recuperação do estado de anestesia foram submetidos à análise de variância e não apresentaram diferença significativa. As análises foram realizadas pelo pacote estatístico Statistic 5.0®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A condição ambiental durante os testes não apresentou variação significativa entre os tratamentos, sendo a temperatura de $23,4 \pm 0,94^{\circ}\text{C}$, o oxigênio dissolvido $6,3 \pm 0,98\text{mg/l}$, o pH $7,4 \pm 0,17$ e a alcalinidade de $55 \pm 7,5\text{mg/l}$ de CaCO_3 , parâmetros estes adequados ao peixe-rei (PIEDRAS et al., 2009).

Tanto a benzocaína como o óleo de cravo, mostraram-se eficientes no processo de anestesia para alevinos de peixe-rei, sendo o tempo de indução depende da concentração dos fármacos. Para o tempo de recuperação não houve diferença significativa entre os diferentes produtos, assim como para as concentrações estudadas.

A efetividade da benzocaína, como anestésico para o peixe-rei, mostrou uma correlação negativa de dependência do tempo de indução de anestesia em relação a concentração, explicada pela equação $Y = 168,69 - 2,849x + 0,0137x^2$ ($R^2=0,89$), sendo que a dosagem que proporcionou o efeito anestésico desejado, no tempo de 30 segundos, sugerido como satisfatório por Roubach e Gomes (2001) e Iwama et al. (2004) foi de $88,75\text{ mg/l}$ (Figura 1). Estes resultados são inferiores aos 100mg/l registrado por Delbon (2006) para tilápia (*Oreochromis niloticus*), e aos 125 mg/l para lambari (*Astianax altiparanae*) (GIMBO et al., 2008). Por outro lado Okamoto et al. (2009) estabeleceram a dosagem entre 50 e 75mg/l de benzocaína para que o pampo (*Trachinotus marginatus*) atinja o estágio 3 de anestesia em 30 segundos. Embora os valores registrados para diversas espécies sejam aproximados, as diferenças de concentração de benzocaína, embora pequenas, mostram a especificidade da ação do fármaco, conforme sugerido por Graham e Iwama (1990) e Iwama et al. (1994).

A concentração de 120mg/l de benzocaína resultou em uma mortalidade de 20% dos animais em até 96 horas após a exposição, o que sugere que a concentração letal, deste anestésico, para alevinos de peixe-rei seja próxima a este valor, resultado este semelhante às 125mg/l, registrado por Gimbo et al. (2008) para lambari (*Astyanax altiparanae*). Antunes et al. (2008) afirmam que os limites entre a concentração ideal de um anestésico e a concentração letal do mesmo para uma determinada espécie, são muito próximos.

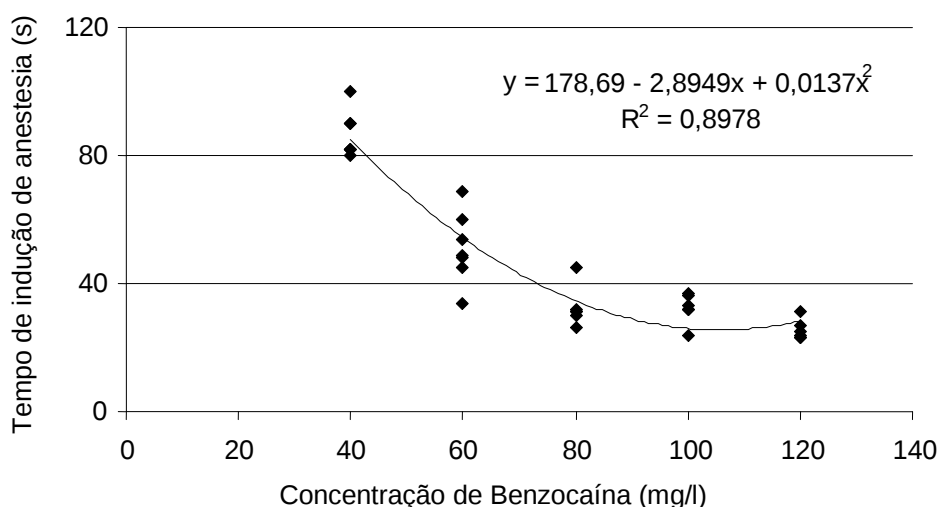


Figura 1 – Relação entre a dosagem de benzocaína (mg/l) e o tempo (s) de indução de anestesia para alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*).

A correlação entre o tempo de indução de anestesia e a concentração de benzocaína, confirma a hipótese de que, maiores concentrações de anestésico resultam em menor tempo para atingir o estado de anestesia desejado, entretanto, este fato matematicamente comprovado, deve ser considerado dentro dos limites fisiológicos da espécie em estudo, pois dosagens elevadas, embora não letais podem levar a distúrbios metabólicos e efeitos deletérios, como danos olfatórios e de visão (BARBOSA et al., 2007; OKAMOTO et al., 2009).

O óleo de cravo como anestésico para alevinos de peixe-rei, mostrou correlação negativa entre a concentração do produto e o tempo de indução de anestesia que é representada pela equação $Y = 60,686 - 1,1988x + 0,00779x^2$

($R^2=0,64$). Considerando como tempo de indução de anestesia ideal de 30 segundos, a concentração de óleo de cravo resultou em 31,74 mg/l (Figura 2).

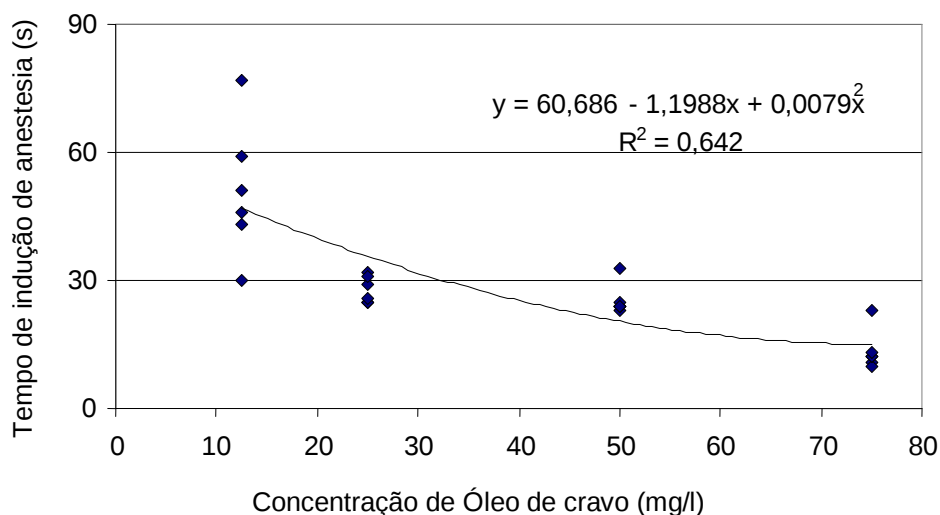


Figura 2 – Relação entre a dosagem de óleo de cravo (mg/l) e o tempo (s) de indução de anestesia para alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*).

Este resultado mostra a eficiência do óleo de cravo como anestésico para alevinos de peixe-rei, confirmando aos registros de 40mg/l obtidos por Keene et al. (1998) para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), 100mg/l, registrado por Delbon (2006) para tilápia e as 50 mg/l para pampo (*Trachinotus marginatus*) (OKAMOTO et al. 2009).

O tempo de recuperação dos animais expostos as concentrações entre 40 e 120mg/l de benzocaína não apresentou diferença significativa variando entre 38,5 e 48,5, com média de $40,5 \pm 11,5$ segundos (Tabela 5), mostrando não haver dependência entre dose e tempo de recuperação, o que já havia sido registrado por Gimbo et al. (2008) para lambari (*Astyanax altiparanae*) expostos a concentrações de 50 a 125mg/l de benzocaína.

Tabela 5 – Tempo de recuperação (segundos) do estado de anestesia e mortalidade (%) de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) submetidos à benzocaína e ao óleo de cravo.

Benzocaina					
Concentração (mg/l)	40	60	80	100	120
Tempo de recuperação (s)	38,5±14,4	48,5±9,1	47,2±9,6	46,8±10,7	48,3±11,3
Mortalidade (%)	0	0	0	0	20
Óleo de cravo					
Concentração (mg/l)	12,5	25	50	75	
Tempo de recuperação	115±16,5	151,0±36	131,5±40,5	132±50,7	
Mortalidade (%)	0	0	0	0	

Semelhante ao ocorrido com a benzocaína, os animais expostos ao óleo de cravo, nas concentrações entre 12,5 e 75 mg/l, não apresentaram diferenças significativas no tempo de recuperação do estado de anestesia. O tempo de recuperação médio foi de 132,03±37,8 segundos, com variação de 115 a 151 segundos. Este tempo de recuperação é inferior ao encontrado por Pereira-da-Silva et al. (2009) para lambari (*Astianax* sp.) de 4 a 7 minutos, bem como os 2 a 8 minutos para juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*) encontrados por Okamoto et al (2009).

Embora os mecanismos fisiológicos da recuperação de peixes submetidos à anestesia não estejam suficientemente esclarecidos, Park et al. (2008) afirmam que quanto menor o tempo de indução de anestesia, maior é o tempo de recuperação, regra esta, que não se aplica ao peixe-rei, pois independente da concentração e do tempo indução de anestesia, o tempo de recuperação não apresentou diferença significativa, o que no caso específico do peixe-rei, pode ser explicado pelo fato deste apresentar, naturalmente níveis de cortisol sanguíneo mais elevados (TSUZUKI et al., 2001), o que resulta uma maior ventilação branquial e oxigenação sanguínea, de maneira que estes níveis de cortisol mais elevados que o peixe-rei apresenta não são de todo negativos.

Lima et al. (2006) discutindo estresse em peixes afirmam que em determinadas situações níveis de cortisol mais levados podem ser benéficos, o que pode ser aplicado para o peixe-rei, em relação ao tempo de recuperação do estado de anestesia. Por outro lado, Barbosa et al. (2007) estudando os efeitos

fisiológicos do óleo de cravo em matrinxã (*Brycon amazonicus*) detectaram que o eugenol não reduz os níveis de lactato. Como o lactato é produto da glicólise anaeróbica, a diminuição da oxigenação do sangue, causada pelo anestésico, não impede a atividade energética celular, embora em escala menor, já que a glicólise anaeróbica produz menos ATP. No caso dos alevinos de peixe-rei, o tempo de recuperação do estado de anestesia, foi independente da concentração de anestésico usada, pois tão logo foi restabelecida a oxigenação sanguínea, as atividades metabólicas retornaram ao estado fisiológico da espécie.

5. CONCLUSÕES

A benzocaína e o óleo de cravo são efetivos como anestésico para alevinos de peixe-rei, proporcionando condições adequadas para o manejo dos animais nas atividades de pesquisa, bem como uma recuperação do estado de anestesia de forma satisfatória e sem a ocorrência de mortalidade, desde que utilizadas as concentrações de até 90 mg/l de benzocaína e 35 mg/l de óleo de cravo.

Na contínua busca pelo conhecimento desta espécie, são necessários novos estudos para avaliar a utilização de anestésicos em animais adultos. Também, torna-se importante avaliar efeitos colaterais, que possam produzir estresses, causadores de respostas fisiológicas, comportamentais, de desempenho produtivo e reprodutivo, ainda desconhecidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, A. P.; MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Anesthetics. Disponível em: <<http://www.ccac.ca/en/.../Fish/Fish%20Anesthetics%20-%20ENG.pdf>>.

Acessado em: 29/07/2010.

ANTUNES, M. I. P. P.; SPURIO, R. S.; GODÓI, D. A.; GRUMADAS, C. E. S.; ROCHA, M. A. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*) Benzocaine hydrochloride anesthesia in carp (*Cyprinus carpio*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 151-156. 2008.

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 20^a ed. United States of América. American Public Health Association, 1998.

ARIAS, H. R. Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 817-843. 1999.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 291-299. 2009.

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

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids, **Integrative Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525. 2002.

BARTON, B. A.; HELFRICH, H. Time-dose responses of juvenile rainbow trout to 2-phenoxyethanol. **Progressive Fish-Culturist**, v.43, n. 4, p. 223-231. 1981.

BEMVENUTI, M. A. *Odontesthes mirinensis*, sp. N. Um Novo Peixe-rei (Pisces, Atherinidae, Atherinopsinae) Para o Sul do Brasil, **Revista Brasileira Zoologia**, v.12, n. 4, p. 881 - 903.1995.

BONETTO, A. A., CASTELLO, H. P. Pesca y Piscicultura en Águas Continentales de América Latina. **Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos**, p. 67-70. Washington D.C. 1985.

BOWSER, P. R. Anesthetic Options For Fish. In: GLEED, R. D.; LUDERS, J. W. Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals. **International Veterinary Information Service**. Ithaca, New York. USA. 2001. Document on line: <<http://www.ivis.org>>. Document N° 1412.0701. Acessado em 29/07/2010.

BRASIL. 2008. Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelece procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Capturado em: 10 out. 2008. Online. Disponível na Internet: <<https://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/>>.

BRESSLER, K.; RON, B. Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **The Israeli Journal of Aquaculture** – Bamidgeh, v. 56, n.1, p. 5-13. 2004.

CARRASCO, S.; SUMANO H.; NAVOHRO-FIERRO, R. The use of lidocaine-sodium bicarbonate as an anesthetic in fish. **Aquaculture**, v. 41, p. 161-163. 1984.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. Anesthetics in Aquaculture. **SRAC Publication**. Texas, n. 3900, p. 6. 2004.

DE BUEN, F. Los pejerreyes (Fam. Atherinidae) en la fauna Uruguya, con descripción de nuevas especies. **Boletim Instituto Oceanográfico**, Montivideo, n. 4, v. 1-2, p. 30-80. 1953.

DELBON, M. C. **Ação da benzocaina e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos da tilápia *Oreochromis niloticus***. Dissertação. (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Jaboticabal. 2006. 82p.

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

FERRIERA, J. T.; SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J.; HOLZAPFEL, C. W. Comparison of anesthetic potency of Benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater species. **Progressive Fish-Culturist**, v. 41, n.3, p. 161-163. 1979.

GALHARDO, L; OLIVEIRA, R. Bem-estar Animal: um Conceito Legítimo para Peixes? **Revista de Etologia**, Lisboa, v. 8, p. 51-61. 2006.

GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. Experimental control of stress hormone levels in fish: techniques and applications. **Review Fish Biology**, v. 4, p. 213-254. 1994.

GILDERHUS P. A. Benzocaine as an anesthetic for striped bass. **Progressive Fish- Culturist**, v. 53, n. 2, p.105-107. 1991.

GIMBO, R. Y.; SAITA, M. V.; GONÇALVES, A. F. N.; TAKAHASHI, L. S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p. 350-357. 2008.

GRAHAM, M.; IWAMA G. K. The Physiologic effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on two salmonid species. **Aquaculture**, v. 90, n. 3-4, p. 323-331. 1990.

IBAMA. **Estátística de Pesca 2005**. Grandes regiões e unidades da federação. Brasília. 115p. 2006.

INOUE, L. A. K.A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 943-947. 2003.

IWAMA, G. K.; ACKERMAN, A. Anesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, J. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes. **Elsevier Science**, Amsterdam, v. 3, p. 1-5. 1994.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; VIJAYAN, M. M. Stress in Fish. **AquaNet Workshop on Fish Welfare**, Campbell River, B.C. Canada, 9p. 2004.

KEENE J. L.; NOAKES D. L. G.; MOCCIA R. D. & SOTO C. G. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 2, p. 89-101. 1998.

KLEEREKOPER, H. **O Peixe-Rei**. Min. Agric. Serv. Infra Estrutura Agrícola. Rio Janeiro, 102 p. 1945.

LABSYNTH. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. FISPQ, n. 110. Disponível em: <<http://downloads.labsynth.com.br/fispq/FISPQ-%20Benzocaina.pdf>>. Acessado em 02/08/2010.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 30, n. 3-4, p. 113-117. 2006.

LITTLE, E. E. Behavioral measures of environmental stressors in fish. In: ADANS, S. M. **Biological indicators of Stress in Fish**, 2ª Ed. American Fisheries Society, Bethesda, 431 p. 2002.

MARKING, L. L., MEYER F. P... Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5. 1985.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 26. p. 231-238. 2003.

MCFARLAND, W. N. A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Publications of the Institute of Marine Sciences**, v. 6, p. 22-55. 1959.

MIRANDA, L. A.; BERSAIN, G. E.; VELASCO, C. A. M.; SHIROJO, Y.; SOMOZA, G. M. Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. **Biocell**, Buenos Aires, v. 30, n. 1, p. 157-162. 2006.

MOLINERO, A.; GONZALEZ, J. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. **Comparative Biochemistry & Physiology A-Comparative Physiology**, v. 111 A, n. 3, p. 405-414. 1995.

MORATO-FERNANDES, J.; PORTELINHA, M. K.; SOUZA, D. M.; ROCHA, C. B.; POUHEY, J. L. O. F.; PIEDRAS, S. R. N. Produção pesqueira após um período de

dez anos da regulamentação da atividade pesqueira nas lagoas mirim e mangueira, RS – Brasil. XI Enpós-UFPEL. **Anais...** CD-Ron 2009.

MOREIRA, P. S. A.; VOLPATO, G. L. Conditioning of stress in Nile tilapia. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p. 961-969. 2004.

OKAMOTO, M. H.; TESSER, M. B. LOUZADA, L. R.; SANTOS, R. A.; SAMPAIO, L. A. Benzocaina e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 866-870. 2009.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884. 2008.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856. 2009.

PIEDRAS, S. R. N. Avaliação das técnicas de produção de larvas de peixe-rei de água doce (*Odontesthes bonariensis* Valenciennes, 1835 e *O. humensis* De Buen, 1953). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 1999. 74f. Dissert. (mestrado) - Pós - Graduação em Zootecnia.

PIEDRAS, S. R. N.; POUEY, J. L. F. Avaliação de quatro dietas balanceadas no crescimento e sobrevivência de larvas de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*). XI Simpósio Brasileiro de Aquicultura. Florianópolis – SC. **Anais...** – CD-Rom. 2000.

PIEDRAS, S. R. N.; POUEY, J. L. O. F.; MAOTOYAMA, I. S.; MARTINS, G. B. Efeito de diferentes concentrações de salinas (NaCl) na sobrevivência de embriões de peixe-rei *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*. **Biotemas**, v. 22, n.3, p. 235-238. 2009.

QUEIROZ J. F.; LOUREÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. A Embrapa e a Aquicultura: Demandas e Prioridades de Pesquisa. **Embrapa Informações Tecnológicas**, Brasileira, 35p. 2002.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 2ª Ed. Oxford: **Blackwell Science**, 159p. 1999.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3ª Ed. Oxford: **Blackwell Science**, 236p. 2008.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40. 2001.

SAMPAIO, L. A., TAKEUCHI, T. STRUSSMANN, C. A. Composição de ácidos graxos de ovos de peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*, ao longo do desenvolvimento embrionário e sua relação com a dieta dos reprodutores. IX SIMBRAQ - SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. Sete Lagoas, MG, 29-31, Outubro, 1996. **Anais...** p. 51. 1996.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620. 2009.

STORKOPF, M. Anaesthesia. In: BROWN, L. Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine. Lindon. UK: **Pergamon Veterinary Handbook Series**, p. 161-168. 1993.

STRUSSMANN, C. A. **Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis***. Tokio: University of Fisheries. 1989. 346f. Tese (doutorado) - Physiology in Fisheries Science.

STRÜSSMANN, C. A.; MORIYAMA, S.; HANKE, E. F.; CALSINA COTA, J. C., TAKASHIMA, F. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. **Journal Fish Biology**, v. 37, p. 532-540. 1996.

TSUZUKI, M. Y.; OGAWA, I. K.; STRUSSMANN, C. A.; MAITA, M.; TAKASHIMA, F. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. M.Y. **Aquaculture**, v. 200, p. 349-362. 2001.