

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

BEATRIZ GNEIDING

**EFEITOS DE DIFERENTES ANESTÉSICOS SOBRE O BEM-ESTAR DE CARPA
CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

Effect of different anesthetics uses on the welfare of grass carp
(*Ctenopharyngodon idella*)

CURITIBA

2017

ii

BEATRIZ GNEIDING

**EFEITOS DE DIFERENTES ANESTÉSICOS SOBRE O BEM-ESTAR DE CARPA
CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)**

Effects of different anesthetics on the welfare of
grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Baldan

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE	x
RESUMO GERAL	xi
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – TRAJETÓRIA DA AQUICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO.....	01
1.2 – A CARPA CAPIM (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	01
1.3 – SENCIÊNCIA EM PEIXES TELEÓSTEOS E MÉTODOS DE ABATE.....	03
1.4 – BASES NEUROENDÓCRINAS DO ESTRESSE EM TELEÓSTEOS.....	04
1.4.1 – O sistema nervoso central e o estresse	04
1.4.2 – Respostas primárias ao estresse	05
1.4.3 – Respostas secundárias ao estresse	07
1.5 – USO DE ANESTÉSICOS EM TELEÓSTEOS.....	08
1.5.1 - Anestesia Inalatória	08
1.5.2 – Anestésicos inalatórios utilizados em teleósteos	10
2 – OBJETIVOS	12
3 – HIPÓTESE.....	12
4 – REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2	21
ARTIGO - Influência do eugenol, benzocaína e gelo sobre o bem-estar da Carpa capim adulta (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	21
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e métodos	24
Resultados	31

Discussão	34
Conclusão	39
Referências	40
CAPÍTULO 3	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

Ao seu lado meu mundo tem mais sentido.
Com seu apoio, pude ir onde jamais havia um dia imaginado.
A você, meu amigo, companheiro, confidente, meu amor,
José Eduardo Gneiding dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Observar por diferentes prismas nos faz refletir sobre coisas nunca antes tidas como relevantes. Isto é a força motriz da humanidade. Contudo a capacidade de pensar nos traz responsabilidades, e com elas, devemos encontrar em nós a forma de contribuir para para tornar o mundo que habitamos um lugar mais justo. Para que eu pudesse chegar aos resultados obtidos e finalizar com êxito o mestrado, tive ao meu lado muitas pessoas, sem as quais, este objetivo jamais seria alcançado.

Agradeço ao universo, pois, apesar das adversidades e contratemplos, sempre conspirou a meu favor. Gostaria de agradecer aos membros da banca de qualificação, professora Dra. Renata E. Macedo e professor Dr. Fabiano Bendhack pelas pertinentes e valorosas contribuições que agregaram à dissertação. Aos membros da banca de defesa, Dr. Humberto Maciel França Madeira, Dr. Paulo Cesar Falanghe Carneiro e Dra. Tâmara Duarte Borges pela gentileza de estar presentes, pela colaboração e agregação de valor. Expresso também minha gratidão à PUCPR, CAPES e ao PPGCA, especialmente a Carol que carinhosa e pacientemente, sempre se prontificou a ajudar. Agradeço de coração a professora Antônia Maria Prado, por toda gentileza e carinho para com seus alunos. Ao professor Humberto Maciel França Madeira, minha gratidão, por ter aceito o desafio de me orientar e proporcionar esta oportunidade em minha vida. A professora Ana Paula Baldan por gentilmente aceitar o convite em me coorientar e por toda a dedicação e apoio durante este processo.

Com o envolvimento de tantas pessoas neste período, tenho receio de ser injusta e me esquecer de alguém, caso aconteça, peço perdão de forma antecipada. Agradeço aos mestres queridos que por minha vida passaram, saibam que sempre os terei como exemplo, e espero um dia chegar a ser para outros, o exemplo que vocês foram para mim. Aos meus colegas de mestrado, deixo o meu muito obrigada, especialmente para Ana Lúcia, Ana Paula, Nicolý, Elisabeth e Karina, pela ajuda em momentos difíceis, pela força no experimento e pelas caronas no período das aulas. O meu reconhecimento aos alunos de iniciação científica Hyon e Juliana, e iniciação científica júnior, Heloísa, pela garra, disposição e empenho, afinal, não foi fácil o trabalho braçal, bem como sacrificar os finais de semana, para apesar de todos os contratemplos obtermos êxito e resultados valorosos.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram presentes no dia do experimento, em especial aos que mesmo com seus problemas pessoais, fizeram questão de comparecer e ajudar. Muito obrigada em especial para Samara, Márcio Zukowski,

Nicolý, Ana Paula, Laís, Daniela, Eduardo, Fabiano e Ana Paula Baldan, a presença de vocês foi de fundamental importância. Durante as análises, gratidão pela ajuda de Daniela, Laís, Hyon, Juliana, Heloísa, Gabriela Maia, Fabiano Bendhack e Ana Paula Baldan.

Muitas pessoas contribuíram pacientemente para que os detalhes fossem compreendidos, se tornassem claros e pudessem ser expostos da maneira mais clara e íntegra possível. Dentre elas agradeço as queridas Marlise Mauerwerk, Daniela Bonoto, Martha Helena Caetano, e em especial, a paciência e dedicação dos professores Saulo Weber e Ana Paula Baldan.

Peço desculpas aos amigos e familiares pela ausência por longo período, sei que as vezes não é simples de compreender, mas infelizmente foi inevitável. Agradeço minha mãe Anna, por cuidar dos meus filhotes cada vez que precisava vir a Curitiba. A minha tia Margit, pois sei o quanto sentiu falta das nossas conversas, grata pela compreensão. Ao meu pai Clemens, por todo o apoio, principalmente nesta etapa final, pela ajuda incondicional, muito obrigada. Ao meu irmão Ivan e minha cunhada Gisele, por me abrigar durante todo este período, sei que a jornada foi longa, gratidão. A minha querida amiga Joelma, por toda ajuda, sempre. A minha amiga-irmã Maricléia, pela ausência em momentos importantes e as irmãs que a vida me deu, que mesmo de muito longe sempre estão presentes, Kaisy Rocha e Cíntia Wandeveld, amo vocês, e certamente não seria quem sou hoje sem vocês em minha vida.

Sou imensamente grata ao meu marido, por sempre me apoiar, e por durante as minhas longas ausências, segurar a onda. Por acreditar em mim, mas acima de tudo, por me fazer acreditar em mim. Obrigada por tudo que fez durante este período para que eu pudesse concluir esta fase da minha vida. Sei dos teus esforços, e palavras não são suficientes para expressar, gratidão eterna meu amor.

E por fim, gostaria de falar sobre os anjos que o universo coloca em nossas vidas. Durante o mestrado, conheci dois: Ana Paula Baldan e Daniela Bonotto. Pessoas que estiveram e se mantiveram ao meu lado durante todo o processo, do início ao fim, não importando quais eram as dificuldades ou o que estava acontecendo ao redor, jamais abandonaram o barco, ao contrário, foram as responsáveis pelos sólidos alicerces desta construção. Vocês são exemplos de seres humanos e de profissionais, os quais sempre levarei comigo. Foi um privilégio de ter encontrado vocês, e ter compartilhado esta experiência de vida. Meu muito obrigado, vocês moram no meu coração.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, justificativa e os objetivos de estudo. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista *Fish Physiology and Biochemistry*. O capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho, além de sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

No Brasil, aproximadamente quatro milhões de pessoas estão envolvidas direta ou indiretamente com a aquicultura, a qual contribui como fonte de renda e produção de alimento. Na última década, o consumo *per capita* de pescado no mundo elevou-se em mais de 100%, ressaltando a preocupação quanto ao bem-estar e redução do estresse desses animais por parte do consumidor de proteína animal, dos pesquisadores, dos desenvolvedores de tecnologias ou dos produtores. É sabido que o estresse nos peixes desencadeia respostas neuroendócrinas, gerando respostas primárias, secundárias e/ou terciárias, o que libera catecolaminas e cortisol, prejudicial para o desenvolvimento, imunidade e reprodução. Na última década, houve certo avanço em relação à anestesia aplicada aos teleósteos, destacando-se o aumento do número de estudos relacionados ao uso de anestésicos e suas respostas neurofisiológicas. Entretanto, as diferenças entre respostas específicas para cada espécie, qualidade e padrões da água, dentre outros fatores, dificultam a pesquisa e o uso prático dos anestésicos nos peixes, e embora hajam estes limitantes, o uso de determinados anestésicos se justifica durante o manejo, transporte ou qualquer outra forma de manipulação, a fim de minimizar o estresse, evitar traumas, morbidades ou até mesmo a morte dos animais. A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) é um peixe nativo da Ásia oriental e foi amplamente distribuída ao redor do mundo como controlador biológico dado seu alto consumo de macrófitas aquáticas, tornando-se desta forma importante espécie de cultivo também no Brasil. Embora seja muito utilizada como modelo experimental por ser um animal de fácil adaptação, não há protocolos anestésicos definidos para a espécie. Desta forma, o estudo dos efeitos de anestésicos sobre essa espécie é relevante tanto sob o aspecto científico, de bem-estar, como de produção. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do eugenol, benzocaína e gelo sobre o bem-estar de carpas capim adultas durante processos sedativos, anestésicos e/ou eutanásicos. Foram utilizados 60 peixes adultos com peso médio de 743,0 (\pm 6,2) g. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os animais foram divididos em oito grupos, conforme o tratamento aos quais foram submetidos, sendo: grupo testemunha (GT), controle (CO), etanol 1,75 mL.L⁻¹ (ET), gelo (GE), eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50), eugenol 250 mg.L⁻¹ (E250), benzocaína 100 mg.L⁻¹ (B100) e benzocaína 300 mg.L⁻¹ (B300). Todos os animais passaram por um período de aclimação de sete dias no sistema de

recirculação. Os animais de um mesmo aquário foram capturados simultaneamente e submetidos individualmente aos respectivos desafios nas câmaras de anestesia. Os estágios anestésicos foram subdivididos em 0, 1, 2, 3 e 4 e o tempo para alcançar cada estágio foi medido. Posteriormente foi realizada coleta do sangue para análises bioquímicas e em seguida, os animais foram eutanasiados por secção medular, biometrados e parte do fígado coletado para análise de glicogênio hepático. Observamos que os peixes do tratamento GE demoraram mais tempo para alcançar os estágios 1 e 2 (69s e 316s) quando comparados aos outros tratamentos (B100 – 31s e 58s; E50 – 25s e 55s; B300 – 17s e 35s; E250 19s e 40s respectivamente). Houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,01$) quanto ao tempo exigido para atingir os estágios anestésicos 3 e 4, contudo, GE foi o que requereu tempo mais longo (394s e 461s). Comparativamente, animais tratados com as menores doses dos anestésicos benzocaína e eugenol demandaram tempo mais longo para alcançar os estágios anestésicos 3 e 4 (E50 = 81s e 132s; B100 = 77s e 105s) do que nas concentrações mais elevadas (E250 = 43s e 62s; B300 = 42s e 57s). Como agentes sedativos e anestésicos, a benzocaína na concentração de 300 mg.L^{-1} proporcionou a resposta mais rápida, seguida do eugenol 250 mg.L^{-1} . Como agentes eutanásicos a benzocaína e o eugenol se mostraram eficazes. Em relação ao bem-estar, o grupo B100 apresentou as concentrações mais altas para as análises de glicose ($141,8 \pm 5,3 \text{ mg.dL}^{-1}$) e cortisol ($187,2 \pm 6,3 \text{ ng.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$). Embora a benzocaína na concentração 100 mg.L^{-1} seja amplamente utilizada como anestésico em peixes, nosso estudo demonstrou esta como agente estressor para carpas capim adultas.

Palavras-chave:

Eugenol ◦ Benzocaína ◦ Bem-estar animal ◦ Carpa Capim ◦ Anestesia ◦ Peixe

ABSTRACT

In Brazil, approximately four million people are directly or indirectly involved in aquaculture, which contributes as a source of income and food production. In the last decade, there has been an increase in the per capita consumption of fish in the world by more than 100%, generating concern on the welfare and stress reduction of these animals, part by the animal protein consumer, the researchers, technology developers and producers. It is known that stress in fish triggers neuroendocrine responses, thus generating primary, secondary and / or tertiary responses, which releases catecholamines and cortisol, detrimental to the development, immunity and reproduction. In the last decade, there has been some progress in relation to anesthesia applied to teleosts, especially the increase in the number of studies related to the use of anesthetics and their neurophysiological responses. However, the differences between species-specific responses, water quality and patterns, among other factors, make it difficult to research and use anesthetics in fish. Although there are these limitations, the use of certain anesthetics is justified during handling, transportation or any other form of manipulation in order to minimize stress, avoid trauma, morbidities or even death of the animals. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), native to East Asia, has been widely distributed around the world as a biological controller, given its high consumption of aquatic macrophytes, becoming an important crop species in Brazil. Although, it is widely used as an experimental model because it is an easily adapted animal, there are no anesthetic protocols defined for the species. Thus, the study of the effects of anesthetics on this species is relevant under the scientific, welfare and production aspects. The aim of this study was to evaluate the effect of eugenol, benzocaine and water ice on welfare during sedative, anesthetic and/or euthanasic processes in adult grass carps. Sixty adult fish were used, with a mean weight of 743.0 (\pm 6.2) g. The experimental design was randomized and the animals were divided into eight groups, according to the treatment to which they were submitted: witness group (WG), control (CO), ethanol 1.75 ml.L⁻¹ (ET), water ice (WI) eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50), eugenol 250 mg.L⁻¹ (E250), benzocaine 100 mg.L⁻¹ (B100) and benzocaine 300 mg.L⁻¹ (B300). All animals underwent a seven-day acclimation period in the recirculation system. The animals from the same aquarium were captured simultaneously and individually submitted to the respective challenges in anesthesia chambers. The anesthetic stages were subdivided into 0, 1, 2, 3 and 4 and the time to

reach each stage was measured. Blood samples were collected for biochemical analysis and then the animals were euthanized by the medullary section. They were biometrically and had part of the liver collected for hepatic glycogen analysis. We observed that WI group ($p < 0.01$) took longer to reach stages 1 and 2 (69s and 316s) when compared to the other treatments (B100 - 31s and 58s, E50 - 25s and 55s, B300 - 17s and 35s, E250s 19s and 40s respectively). There was a statistical difference between the groups ($p < 0.01$) regarding the time required to reach the anesthetic stages 3 and 4, however, WI required the longest time (394s and 461s). Comparatively, animals treated with lower doses of benzocaine and eugenol anesthetics required longer time to reach anesthetic stages 3 and 4 (E50 = 81s and 132s; B100 = 77s and 105s) than in the higher concentrations (E250 = 43s and 62s; B300 = 42s and 57s). As sedatives and anesthetics, benzocaine at the concentration of 300 mg.L^{-1} provided the fastest response, followed by eugenol 250 mg.L^{-1} . As euthanasic agents, benzocaine and eugenol were effective. In relation to welfare, B100 group had the highest concentrations for glucose ($141.8 \pm 5.3 \text{ mg.dL}^{-1}$) and cortisol ($187.2 \pm 6.3 \text{ ng.mL}^{-1}$) ($p < 0.05$). Although benzocaine at 100 mg.L^{-1} concentration is widely used as an anesthetic in fish, our study demonstrated this as a stressor agent for adult grass carps.

Keywords:

Eugenol ◦ Benzocaine ◦ Animal Welfare ◦ Grass Carp ◦ Fish ◦ Anesthesia

CAPÍTULO 1

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – TRAJETÓRIA DA AQUICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

Atualmente a aquicultura é uma forma alternativa para subsistência humana como fonte de renda e alimentação mundial (Tavares-Dias e Mariano, 2015). O aumento no consumo *per capita* de pescado no mundo ultrapassou o índice de 100% entre 1960 (9,9kg) e 2012 (19,2 kg). Esse consumo não é igual entre os países, nem mesmo dentro deles e pode variar anualmente de menos de 1 kg para mais de 100 kg. Isso ocorre devido aos hábitos culturais, alimentares, sazonalidade, proximidade com a costa, hábitos haliêuticos, recursos econômicos, dentre outros (FAO, 2016).

No Brasil, aproximadamente quatro milhões de pessoas estão envolvidas direta ou indiretamente com o setor, e o país possui uma das maiores bacias hidrográficas do mundo, além de uma costa marinha de 8.400 km de extensão. Na última década o crescimento anual da aquicultura foi de 9% no país, ficando apenas atrás do Chile na produção do continente americano. Estima-se que a aquicultura seja responsável pelo sustento de 10% a 12% da população no globo (FAO, 2016).

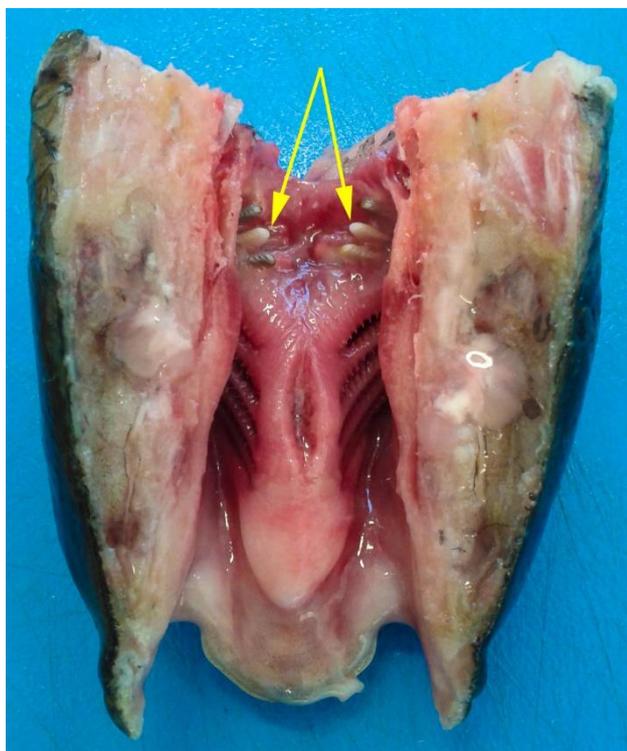
1.2 – A CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)

Nativa dos grandes lagos e rios da Ásia Oriental, a carpa capim é considerada uma espécie de clima subtropical e temperado, tolerando temperaturas entre 0 °C e 33 °C (Shireman e Smith, 1983; Cudmore e Mandrak, 2004). Herbívora e de fácil adaptação, a carpa capim foi amplamente introduzida pelo mundo, com o principal intuito de controlar macrófitas aquáticas (Cross, 1969; George, 1982), e seu uso como controlador biológico tem se elevado devido à grande capacidade de consumo de matéria vegetal (Allen e Wattendorf, 1987).

No Brasil, o cultivo das carpas iniciou-se com as colonizações alemã e italiana, e teve como principais produtores os estados da Região Sul (Borghetti et al. 2003). A carpa capim e outras espécies exóticas têm vantagens competitivas quando comparadas às espécies nativas, pois além de serem rústicas, existem muitas informações sobre suas características biológicas (Borghetti et al. 2003). Os

indivíduos de vida livre vivem entre cinco e 11 anos, porém foram encontrados animais na natureza com mais de 33 anos (Shireman e Smith, 1983; Cudmore e Mandrak, 2004). Da família *Cyprinidae*, a carpa capim é um dos maiores representantes, e a única do gênero, não havendo nenhuma subespécie (Shireman e Smith, 1983; Chilton e Muoneke, 1992).

As carpas capim possuem escamas e um corpo alongado. A alimentação é baseada em matéria vegetal, contudo se adaptam bem à ração (Zavala–Camin 1996; Rodrigues et al. 2013). Nas primeiras semanas de vida não são herbívoras, alimentando-se de zooplâncton e outros animais microscópicos. Apenas quando se tornam alevinos é que mudam os hábitos alimentares e passam a ingerir algas filamentosas e caules macios (Vietmeyer, 1976). Como os outros ciprinídeos, não possuem dentes maxilares e mandibulares, mas dentes faríngeos (Figura 1). Ligados aos ossos da faringe superior e inferior, estes promovem a trituração do alimento e, assim, tornam-se especializados em rasgar e triturar o material vegetal, promovendo a quebra da parede celular do alimento (Zavala–Camin 1996; Hickling, 2009; Rodrigues et al. 2013).



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 1 – Corte sagital da cabeça de um indivíduo de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) evidenciando os dentes faríngeos.

1.3 - SENCIÊNCIA EM PEIXES TELEÓSTEOS E MÉTODOS DE ABATE

Pedrazzani et al. (2007) define senciência como a "capacidade de ter consciência de sensações, portanto, ter sentimentos subjetivos". O caráter subjetivo associado ao comportamento e consciência indica que talvez não sejamos capazes de compreender em sua plenitude esse fator, contudo, somos impelidos a aceitar sua existência (Nagel, 1974). Em peixes, se pode notar as mesmas estruturas cerebrais envolvidas no circuito da dor também presentes em outros vertebrados ditos como superiores (Pedrazzani et al. 2007). Quando comparado aos mamíferos, os peixes não possuem néocortex, responsável pela atribuição das cognições superiores, e especialmente nos humanos pela consciência (Lent, 2008). Entretanto, a declaração de cambridge sobre consciência (Low et al. 2012) afirma que o fato de não ter neocórtex, aparentemente não impede um animal de sentir emoção, pois existem evidências de que animais não humanos também possuem substratos neurológicos que geram consciência.

Neste sentido, pesquisas com peixes mostram que estes são susceptíveis a dor, uma vez que possuem nociceptores (receptores sensoriais da dor) (Guyton e Hall, 2006) e fazem a percepção dos estímulos nocivos, sejam estes sensoriais e/ou emocionais (Sneddon, 2006). No experimento realizado por Sneddon et al. (2003) com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), foram classificados como nociceptores 22 dos 58 receptores encontrados na cabeça do animal. Além disso, mediante injeção de ácido acético na região dos lábios, as trutas arco-íris apresentaram comportamentos anômalos, como esfregarem-se nas laterais do tanque e contra cascalhos, sugerindo que tais comportamentos seriam tentativas de minimizar dor e desconforto.

Desta forma, é importante considerar a nocicepção frente aos métodos de abate e cultivo de peixes, pois um dos métodos mais utilizados para abate, o choque térmico com água e gelo por períodos entre 10 a 15 minutos, não é considerada humanitária e nem satisfatória em decorrência do tempo necessário e da consciência do animal durante o processo. Já o choque elétrico, golpe letal na cabeça e secção medular são métodos físicos que geram menos sofrimento para os peixes (Pedrazzani et al. 2009; Viegas et al. 2012). A técnica de choque térmico com água e gelo causa uma morte lenta, mostrando ser um método estressante ou até mesmo ineficaz, dependendo da espécie, além disso, muitas vezes pode causar paralisação,

mas não efetivamente a morte. Como diferentes espécies de peixe apresentam comportamentos fisiológicos distintos, a adoção de diversas técnicas de abate pelos abatedouros é desejável. Embora existam leis que definam o abate para os demais animais de interesse zootécnico, os peixes ainda não se inserem nesse contexto (portaria nº 47 de 19 de março de 2013). Desta forma, a maneira com a qual o animal será abatido, irá se basear apenas em redução de tempo e custos (Viegas et al. 2012).

Inseridos na temática do bem-estar, o abate humanitário de animais, incluindo o de peixes, vem se tornando objeto de crescente preocupação, seja por parte do consumidor de proteína animal, de pesquisadores, de desenvolvedores de tecnologias e de produtores (Oliveira e Galhardo, 2006). Pesquisas objetivando a diminuição do estresse e sofrimento dos animais são essenciais para se definirem técnicas adequadas de abate (Viegas et al. 2012).

1.4 – BASES NEUROENDÓCRINAS DO ESTRESSE EM TELEÓSTEOS

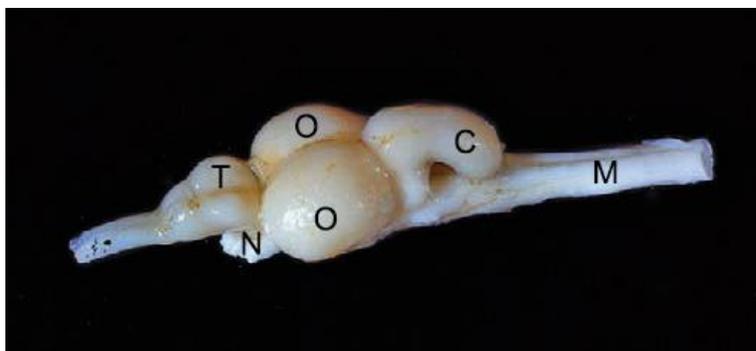
A sobrevivência dos peixes teleósteos está intimamente ligada à manutenção do equilíbrio ou homeostase, a qual deve ser constantemente reestabelecida para garantir a adaptação do animal ao seu ambiente (Chrousos e Gold, 1992). Quando há uma alteração nesta condição de homeostase, pode-se considerar que o animal está sob uma situação de estresse (Barton e Iwama, 1991), o que desencadeia uma resposta endócrina (Farrell, 2011). A percepção da circunstância de ameaça pelo peixe é o fator que gera a resposta neuroendócrina (Evans et al. 2014). Dada a condição de estresse, ocorre o estímulo no hipotálamo, que por sua vez incita o sistema neuroendócrino, desencadeando uma cascata metabólica (Martínez–Porchas et al. 2009; Rudneva, 2014).

1.4.1 – O sistema nervoso central e o estresse em peixes

Os peixes possuem um cérebro rudimentar (Figura 2), contudo, apresentam características conspícuas em seu sistema neuroendócrino. Dentre elas, longas células neurosecretoras, que vão do hipotálamo à adenoipófise e que são responsáveis pela liberação hormonal, não estando presente o sistema porta-hipotálamo-hipofisário, como nos mamíferos (Baldisserotto, 2013). Com exceção de

alguns grupos de teleósteos, geralmente não possuem glândula adrenal (Roberts, 2012), contudo esta função é desempenhada por dois grupos celulares, as células cromafins e as inter-renais (Gallo e Civinini, 2003; Baldisserotto, 2013).

As células cromafins geralmente estão em contato com o tecido inter-renal, mas podem ser encontradas em outras regiões, como amontoados entre o rim e a coluna vertebral por exemplo (Roberts, 2012) sendo responsáveis pela produção das catecolaminas (CAs) adrenalina e noradrenalina (Baldisserotto, 2013). As células inter-renais são um grupo de células eosinofílicas com formato cubóide, localizadas no rim, geralmente associadas a vasos sanguíneos (Roberts, 2012), e responsáveis pela produção de cortisol (Baldisserotto, 2013).



Fonte: Roberts, (2012) com modificações.

Figura 2 – Cérebro de salmão do Atlântico

T – telencéfalo; N = nervo óptico; O – lobos ópticos; C – cerebelo;
M – medula espinhal.

A hipófise tem forma variável de acordo com a espécie, localiza-se na base do cérebro, ligada ao hipotálamo (Papoutsoglou, 2012). O sistema neurosecretor caudal está situado no final da medula espinhal (Craig et al. 2005), formado por células neurosecretoras, possuem uma estrutura de armazenamento denominada urófise, (correspondente à neuroipófise dos mamíferos). Esse sistema é responsável pela produção de urotensinas (UI e UII), vasocitocina e isocitocina (Baldisserotto, 2013).

1.4.2 – Respostas primárias ao estresse

O estressor, ao estimular o sistema nervoso central (SNC) faz com que este libere hormônios primários do estresse na corrente sanguínea (Iwama, 1998;

Martínez-Porchas et al. 2009; Farrell, 2011). Essa liberação ocorre por meio de duas vias principais, o eixo cérebro simpático cromafins (CSC) e o eixo hipotálamo pituitária inter-renal (HPI) (Farrell, 2011; Evans et al. 2014) com intuito de disponibilizar energia para os órgão e tecidos (Weerd e Komen, 1998).

- Eixo cérebro simpático cromafins - CSC

Similar ao eixo simpático adrenal medular nos mamíferos, o eixo CSC é responsável pelo aumento imediato das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) na corrente sanguínea e tem como precursor a tirosina (Papoutsoglou, 2012). As catecolaminas são produzidas e liberadas pelas células cromafins do rim cranial (Evans et al. 2014), e os responsáveis pelo controle desta liberação são basicamente fibras colinérgicas (Pankhurst, 2011) pré-ganglionares de nervos simpáticos (Farrell, 2011).

Alguns segundos após o estímulo estressor, as células cromafins liberam catecolaminas na corrente sanguínea. O armazenamento desses hormônios em vesículas dentro das células permitem que essa liberação ocorra de forma rápida. O nível plasmático basal pode aumentar em até 50 vezes em situações de estresse, no entanto, sua vida plasmática é curta, de aproximadamente 10 minutos. No caso de estresse crônico, os níveis plasmáticos podem permanecer aumentados por longos períodos (Evans et al. 2014).

- Eixo hipotálamo pituitária inter-renal - HPI

Correspondente ao eixo hipotálamo hipófise adrenal nos mamíferos, o eixo HPI nos peixes é responsável pela liberação do cortisol. Após a síntese e liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e urotensina I (IU) pelo hipotálamo, ocorre o estímulo da pituitária para a liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que irá incitar as células inter-renais na produção e liberação do cortisol, sendo este o principal corticosteroide em peixes teleósteos (Evans et al. 2014; Jeffrey, 2014).

Por ser hidrofóbico, o cortisol é incapaz de ser armazenado em vesículas, sendo sintetizado sob demanda (Evans et al. 2014). Posteriormente ao estímulo

estressor, a elevação dos níveis plasmáticos de cortisol se inicia, aproximadamente, após 5 minutos (Farrell, 2011) e pode ser mensurado na corrente sanguínea após 10 minutos (Baldisserotto, 2013). Por esta razão, esse processo é o parâmetro mais utilizado para avaliação de estresse em peixes (Evans et al. 2014).

1.4.3 – Respostas secundárias ao estresse

Após liberados, os hormônios estimulam vias metabólicas, resultando em alterações bioquímicas e fisiológicas (Iwama, 1998; Martínez–Porchas et al. 2009; Papoutsoglou, 2012). Isso ocorre de maneira a proporcionar ao animal energia suficiente para responder às condições de luta ou fuga geradas pelo sinal de perigo (Weerd e Komen, 1998), que são acionadas pelo estressor (Rottmann et al.1992).

A catecolamina adrenalina é a primeira a atuar, com ação fundamental e imediata, sendo responsável pelo estímulo da glicogenólise (Farrell, 2011). O aumento da disponibilidade de glicose é importante, pois servirá como fonte de energia para músculos e tecidos (Iwama et al, 1999, Rudneva, 2014). A elevação da frequência cardíaca aumenta o fluxo sanguíneo, principalmente para o cérebro, músculos e brânquias. Ocorre assim, o aumento das trocas gasosas e a oxigenação é otimizada pela ação da noradrenalina, a qual potencializa a afinidade da hemoglobina pelo o oxigênio (Pankhurst, 2011; Farrell, 2011; Jeffrey, 2014).

1.5 – USO DE ANESTÉSICOS EM TELEÓSTEOS

Do grego anaisthēsía, anestesia significa segundo o dicionário Michaelis (Walter, 2017), “perda parcial ou total da sensibilidade, induzida por uma substância anestésica, a fim de evitar a dor em um procedimento cirúrgico [...]”. É utilizada também como facilitadora para o manejo do peixe, diminuindo riscos e evitando picos elevados de estresse (Longley et al. 2008; Fabiani et al. 2013; Bernardes Júnior et al. 2013).

Na última década, houve certo avanço em relação à anestesia aplicada aos teleósteos, destacando-se o aumento do número de estudos relacionados ao uso de anestésicos e suas respostas neuro-fisiológicas (Grimm et al., 2015). Seu uso para a contenção se justifica durante o manejo, transporte ou outras formas de manipulação. Dessa forma, evitam-se traumas, morbidades ou até mesmo a morte

(West et al. 2007; Tarkhani et al. 2017). A anestesia, também facilita o diagnóstico de possíveis enfermidades, bem como, contribui para o tratamento adequado (Tranquilli et al. 2014). Entretanto, as diferenças entre respostas específicas para cada espécie, qualidade e padrões da água, dentre outros fatores, transformam a anestesia em peixes em uma área de pesquisa desafiadora (Grimm et al. 2015).

1.5.1 – Anestesia Inalatória

Técnica amplamente utilizada, a anestesia inalatória é baseada na diluição do fármaco em meio aquoso e inalação pelo animal (Longley et al. 2008; Ross e Ross, 2008; Tranquilli et al. 2014). As moléculas chegam rapidamente ao sangue arterial eferente e posteriormente ao sistema nervoso central (Longley et al. 2008; Ross e Ross, 2008). O desafio é encontrar o equilíbrio entre a concentração adequada do fármaco escolhido e o estágio anestésico desejado (West et al. 2007). Desta forma, é de fundamental importância o monitoramento do animal durante o procedimento em razão dos estágios anestésicos progressivos (Tranquilli et al. 2014).

Embora haja descrição didática dos estágios progressivos de sedação e anestesia em peixes, questões como a especificidade da espécie, metodologia aplicada, fármaco eleito e qualidade da água tornam esta descrição apenas uma fonte de embasamento inicial (Ross e Ross, 2008; Grimm et al. 2015). Além disso, a proporção entre dose anestésica e tempo de exposição pode ter como resultado sedação, anestesia ou morte (Ross e Ross, 2008). Quando utilizadas doses muito elevadas do fármaco, os estágios podem se tornar visualmente indistinguíveis (Longley et al. 2008). A subdivisão dos estágios variam de acordo com o autor, sendo apresentada a seguir uma dessas classificações (Tabela 1).

Tabela 1 – Estágios Anestésicos progressivos em peixes teleósteos

Estágio	Denominação	Descrição dos sinais
Estágio 0 (E0)	Normal	Reage aos estímulos externos; respiração opercular normal
Estágio 1 (E1)	Sedação leve	Respiração opercular diminuída; respostas visual e aos estímulos táteis diminuídas
Estágio 2 (E2)	Sedação profunda	Reage contra estímulos maiores
Estágio 3 (E3)	Anestesia superficial	Perda de coordenação e tônus muscular; reage somente contra estímulos táteis fortes
Estágio 4 (E4)	Anestesia profunda	Hiporreatividade e arreflexia; redução nas frequências cardíaca e respiratória
Estágio 5 (E5)	Depressão bulbar	Parada opercular; morte; Superdose

Fonte: Tranquilli et al., 2014.

A recuperação ocorre, usualmente, de forma rápida após cessar-se a exposição do animal ao anestésico. Entretanto dependendo da espécie, fármaco, tempo de exposição ou a presença de alguma enfermidade, o período de recuperação pode se estender por dias (West et al. 2007; Ross e Ross, 2008). Além disso, quando o animal é em seguida alocado para recuperação em um sistema fechado, poderá ocorrer excreção e reabsorção do anestésico ou de seus metabólitos, adiando a reabilitação. Porém, em média, a recuperação acontece em aproximadamente cinco minutos após encerrada a exposição do animal ao anestésico (West et al. 2007).

Os métodos químicos utilizados para eutanásia são realizados com overdose de fármacos anestésicos, situação na qual devem ser considerados o peso, fase da vida e espécie do peixe para a definição da dose a ser empregada (West et al. 2007;

Ross e Ross, 2008).

1.5.2 – Anestésicos Inalatórios Utilizados em Teleósteos

Diversos fármacos são aplicados como anestésicos inalatórios em peixes, a exemplo do metanossulfonato de tricaína (MS-222), que, apesar de ser o anestésico mais utilizado fora do Brasil (Sawyer, 2007; Guénette et al. 2007; Longley et al., 2008), pode ter sua margem de segurança reduzida sob determinadas situações. Além de não ser indicado para sistemas de recirculação (Longley et al. 2008), o composto é considerado potencialmente oncogênico, sendo necessário período de 21 dias de carência entre o abate e o consumo (Guénette et al. 2007; Sawyer, 2007). Por sua vez, a quinaldina (2-metilquinolona), pode provocar danos nas córneas, irritação nas brânquias e aumento na secreção de muco. O metomidato, provoca pigmentação e fasciculação muscular, além de gerar um período de recuperação prolongado em relação a média de cinco minutos após a cessação da exposição ao fármaco (Sawyer, 2007).

A benzocaína (etil-4-aminobenzoato) apresenta boa margem de segurança e eficiência; não é tóxica para humanos nas concentrações comumente utilizadas para os peixes (entre 25 e 200 mg.L⁻¹) (Gomes et al. 2001; West et al. 2007; Ross e Ross, 2008; Longley et al. 2008; Fabiani et al. 2013). Pode ser facilmente removida dos tanques por meio de filtros de carvão ativado. As moléculas de benzocaína presentes na água e não absorvidas sofrem degradação em um período de até quatro horas, diminuindo assim a probabilidade de risco ao meio ambiente (Ross e Ross, 2008). Possui como vantagem a não influência quanto ao desenvolvimento do animal ou a capacidade reprodutiva (West et al. 2007; Ross e Ross, 2008; Bittencourt et al. 2012).

A benzocaína pode ser utilizada como anestésico inalatório em peixes de água marinha e de água doce (Ross e Ross, 2008), e as doses tipicamente utilizadas variam entre 25 e 200 mg.L⁻¹, de acordo com o peso do animal e a espécie (Hayton et al. 1996; Ross e Ross, 2008; Flecknell, 2009). Por não ser hidrossolúvel, precisa ser diluída em etanol ou acetona, para posterior diluição em água (Sawyer, 2007; Grimm et al. 2015).

Outro anestésico também amplamente utilizado para peixes é o eugenol (2-metóxi-4-prop-2-enil-fenol), derivado do óleo de cravo e utilizado em concentrações de 85% a 95% (West et al. 2007; Sawyer, 2007; Ross e Ross, 2008; Vidal et al.

2008; Bernardes Júnior et al. 2013; Sutili et al. 2013; Tarkhani et al. 2017). O eugenol é obtido a partir de extratos da árvore do cravo da Índia (*Eugenia aromaticum*, *Syzygium aromaticum* e *Eugenia caryophyllata*) (Ross e Ross, 2008; Javahery et al. 2012; Bernardes Júnior et al. 2013; Fabiani et al. 2013; Davis et al. 2015), possuindo sabor e odor característicos que são atribuídos à presença abundante de terpenos. Os terpenos, por sua vez, podem ser também responsáveis por deixar traços de sabor na carne, o que pode ser atenuado com o uso de produtos com alto teor de purificação (Ross e Ross, 2008; Javahery et al. 2012).

O eugenol possui baixo custo quando comparado a outros anestésicos, não é tóxico para seres humanos nas doses utilizadas em procedimentos anestésicos em peixes e apresenta grande margem de segurança para os mesmos (Ross e Ross, 2008; Bernardes Júnior et al. 2013; Ramírez-Duarte et al. 2013; Rocha et al. 2015; Tarkhani et al. 2017). Confere maior tranquilidade ao animal, além de anestesia mais estável, em comparação a outros anestésicos inalatórios (West et al. 2007; Longley et al. 2008; Vidal et al. 2008).

O eugenol pode ser utilizado em peixes de água doce e marinha como anestésico de imersão (Longley et al. 2008), e a dose usualmente utilizada varia de 25 mg.L⁻¹ a 100mg.L⁻¹ (Sawyer, 2007). Por também não ser solúvel em água, o eugenol deve ser diluído previamente em etanol (West et al. 2007; Longley et al. 2008; Ross e Ross, 2008; Moreira et al. 2015). De fácil obtenção, é utilizado em altas doses, como agente eutanásico em peixes ornamentais, sendo normalmente utilizadas doses cinco a dez vezes superiores à dose padrão (West et al. 2007; Longley et al., 2008; Ross e Ross, 2008). O eugenol, após alcançar a corrente sanguínea, atravessa a barreira hematoencefálica e, dependendo da dose e tempo de exposição, ocasiona a morte por parada respiratória seguida de parada cardíaca (Davis et al. 2015). Estudo realizado por Guénette et al. (2007) sobre a farmacocinética do eugenol, utilizando como modelo a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), revelou curva bifásica de eliminação do fármaco. Nesse estudo, mais de 50% do composto foi eliminado na primeira hora, com quedas significativas nos primeiros 15 minutos e apresentou meia vida de 12 horas, sugerindo a ocorrência de circulação entero-hepática.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da benzocaína, do eugenol e do gelo sobre o bem-estar durante o procedimento de anestesia da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*).

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) a diferentes doses de benzocaína, eugenol e gelo como sedativos, anestésicos ou agentes eutanásicos.
- Analisar o efeito da benzocaína, eugenol e gelo sobre o bem-estar animal, pela medição dos níveis de cortisol sérico, glicemia plasmática e níveis de glicogênio hepático.

3 – HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que o uso dos fármacos anestésicos benzocaína e eugenol durante o manejo da carpa capim, concomitantemente a seu efeito sedativo ou anestésico, proporcionam maior bem-estar ao animal, quando comparados ao manejo sem o uso desses compostos ou com uso de gelo.

4 – REFERÊNCIAS

Allen SK, Wattendorf RJ (1987). Triploid grass carp: status and management implications. Fisheries 12:20-24. doi:10.1577/1548-8446(1987)012<0020:TGCSAM>2.0.CO;2

Baldisserotto B (2013) Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3rd edn. 2013 pp 352, Mato Grosso. ISBN: 8573911174

Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual review of fish diseases 3-26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G

Bernardes Júnior JJ, Nakagome FK, Mello GL, Garcia S, Bernardes Júnior HA (2013) Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. Pesquisa agropecuária brasileira 48: 1140-1144. DOI.org/10.1590/S0100-204X2013000800049

Bittencourt F, Souza BE, Boscolo WR, Rorato RR, Feiden A, Neu DH (2012) Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 64:1597-1602. doi:10.1590/S0102-09352012000600028

Bonar AS, Sehgal HS, Pauley GB, et al (1990) Relationship between the chemical composition of aquatic macrophytes and their consumption by grass carp, *Ctenopharyngodon Idella*. J Fish Biol, 36:149-157. doi: 10.1111/j.1095-8649.1990.tb05591.x

Borghetti NRB, Ostrensky A, Borghetti LR (2003) Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba:Grupo Integrado de aquicultura e estudos ambientais, pp 128. ISBN 85-903447-1-1

Chilton III EW, MI Muoneke (1992) Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: a North American perspective. Fish Bio. Fish. doi: 10.1007/BF00043520

Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA. 267:1244–1252

Clements KD, Gleeson VP, Slaytor(1994) Short-chain fatty acid metabolism in temperate marine herbivorous fish. Journal of Comparative Physiology B, 164:372-377.

Craig PM, Al-Timimi H, Bernier NJ (2005) Differential increase in forebrain and caudal neurosecretory system corticotropin-releasing factor and urotensin I gene expression associated with seawater transfer in rainbow trout. Endocrinology 146:3851–386. DOI: 10.1210/en.2005-0004

Cross DG (1969) Aquatic weed control using grass carp. J Fish Biol 1:27-30. doi: 10.1111/j.1095-8649.1969.tb03842.x

Cudmore B, Mandrak NE (2004) Biological synopsis of grass carp (*Ctenopharyngodon della*). Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences, pp 44. ISSN: 0706-6473

Das KM, Tripathi SD (1991) Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon Idella* (Val.). Aquaculture 92:21-32. doi:10.1016/0044-8486(91)90005-R

Davis DJ, Klug J, Hankins M, Doerr HM, Monticelli SR, Song A, Gillespie CH, Bryda EC (2015) Effects of clove oil as a euthanasia agent on blood collection efficiency and serum cortisol levels in *Danio rerio*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, Vol 54, No 5.

Evans DH, Claiborne JB, Currie S (2014) *The Physiology of Fishes*. CRC Press. Boca Raton. ISBN 10: 1439880301

Fabiani BM, Boscolo WR, Feiden A, Diemer O, Bittencourt F, Neu DH (2013) Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brycon hilarii*. *Acta Scientiarum* 35:113. DOI: 10.4025/actascianimsci.v35i2.16644

FAO (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>

Farrell AP (2011) *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Elsevier Inc, Amsterdam. ISBN: 978-0-12-374545-3

Flecknell P (2009) *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3edn. Elsevier, London ISBN-10: 0123693764

Gallo VP, Civinini A (2003) Survey of adrenal homolog in teleosts. *International Review of Cytology* 230:89–187. DOI:10.1016/S0074-7696(03)30003-8

George TT (1982) The Chinese grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), its biology, introduction, control of aquatic macrophytes and breeding in Sudan. *Aquaculture* 27:317-327. DOI:10.1016/0044-8486(82)90068-0

Gomes LC, Chipari-gomes A R, Lopes NP, Roubach R, Araujo-Lima CARM (2001) Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 32, No. 4. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x

Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA (2015) *Veterinary anesthesia and analgesia*, 4edn. Blackwell, Iowa ISBN-10: 1118526236

Guénette AS, Uhland FC, Hélie P, Beaudry F, Vachon P (2007) Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266:262–265. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.046

Guyton AC, Hall, John E (2006) *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier, Rio de Janeiro. ISBN 978-85-352-1641-7

Hayton WL, Szoke A, Kemmenoe BH, Vick AM (1996) Disposition of benzocaine in channel catfish. *Aquatic Toxicology* 36:99-113. Elsevier, Amsterdam. DOI: 10.1016/S0166-445X(96)00792-8

Hickling CF (1966) On the feeding process in the white amur, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Zoology*, 148:408–419. DOI:10.1111/j.1469-7998.1966.tb02960.x

Iwama GK (1998) Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:304-310. DOI:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x

Iwama GK, Vijayan MM, Fortsyth RB, Ackerman PA (1999) Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoologist* 39:901-909. DOI:.1093/icb/39.6.901

Javahery S, Nekoubin H, Moradlu AH (2012) Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry* 38:1545–1552 doi: 10.1007/s10695-012-9682-5

Jeffrey JD (2014) The roles of social status, maternal stress, and parental investment in modulation of hypothalamic-pituitary-interrenal axis function in teleost fish. Thesis submitted to the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies. Carleton Institute of Biology. doi: 10.20381/ruor-6335

Lent, Roberto (2008) *Neurociência da mente e do comportamento*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. ISBN 978-85-277-1379-5

Low P. Editado por Panksepp J, Reiss D, Edelman D, Swinderen BV, Low P, Koch C (2012) The Cambridge declaration on consciousness. Cambridge, UK. Disponível em: <http://fcmconference.org/img/CambridgeDeclarationOnConsciousness.pdf>

Longley L, Fiddes M, O'Brien M (2008) Anaesthesia of exotic pets. Elsevier, London, pp 314 ISBN-13: 978-0702028885

Martínez-Porchas M, Martínez CLR, Ramos ER (2009) Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences 4:158-178. doi:10.1093/icb/42.3.517

Moreira AGL, Coelho AAC, Albuquerque LFG, Moreira RT, Farias WRL (2015) Efeito do eugenol como agente mitigador do estresse no transporte de juvenis de tilápia do Nilo. Pesquisa Veterinária Brasileira 35: 893-898. doi: 10.1590/S0100-736X2015001100004

Nagel T. (1974) What is it like to be a bat? Philosophical Review 83: 435–450. Available at <http://cepa.info/2399>

Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. Ilar Journal 50:343-360. ISSN:1084-2020

Oliveira R, Galhardo L (2006) Bem-estar animal: um conceito legítimo para peixes? Revista de Etologia 8:51-61. ISSN: 2175-3636

Pankhurst NW (2011) The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. General and Comparative Endocrinology 170:265-75. doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.017

Papoutsoglou SE (2012) Textbook of fish endocrinology. Nova Science Publishers, New York. ISBN: 978-1-62100-376-2

Pedrazzani AS, Molento CFM, Carneiro PCF, Fernandes-de-Castilho M (2007) Senciência e bem-estar de peixes: uma visão de futuro do mercado consumidor. *Panorama da Aquicultura* 102:24-29. ISSN: 1519-1141

Pedrazzani AS, Carneiro PCF, Kirschnik PG et al (2009) Impacto negativo de secção de medula e termonarrose no bem-estar e na qualidade da carne da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10:188-197. doi:10.1590/1678-457x.05616

Ramírez-Duarte WF, Pineda-Quiroga C, Martínez RN, Eslava MPR (2013) Evaluación del cloruro de sodio, eugenol y zeolita en el confinamiento de *Ancistrus triradiatus*. *Orinoquia - Universidad de los Llanos* 17: 84-95. ISSN 0121-3709

Roberts RJ (2012) *Fish Pathology*. 4rd edn. Blackwell Publishing, London. ISBN 978-1-4443-3282-7

Rocha AF, Stech MR, Pinheiro MFM, Pagani D M, Sukekava CF (2015) Use of eugenol as na anaesthetic for *Geophagus brasiliensis* juveniles. *Boletim do instituto da pesca* 41:697–705. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2799

Rodrigues APO, Lima AF, Alves AL, Rosa DK, Torati LS, Santos VRV (2013) *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília, DF: Embrapa, pp 440p. ISBN 978-8570352729

Ross LG, Ross B (2008) *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3 edn. Blackwell Publishing, Oxford. ISBN 978-1-4051-4938-9

Rottmann RW, Francis FR, Durborow R (1992) The role of stress in fish disease. southern regional aquaculture center. Disponível em: http://www.aces.edu/dept/fisheries/education/ras/publications/disease_mgt/stress474fs.pdf

Rudneva I (2014) *Biomarkers for stress in fish*. CRC Press, Boca raton. ISBN 13: 978-1-4822-0739-2

Sawyer DC (2007) The practice of veterinary anesthesia: small animals, birds, fish and reptiles. Teton NewMedia, Wyoming ISBN-10: 1591610346

Shireman JV, CR Smith (1983) Synopsis of biological data on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). In: FAO Fish.Synop, 135:86

Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ (2003) Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. Proc. R. Soc. Lond. 270:1115–1121. doi: 10.1098/rspb.2003.2349

Sneddon LU (2006) Ethics and welfare: pain perception in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 26:6-10. ISSN:2233-5412

Stevens CE, Hume ID (2004) Comparative physiology of the vertebrate digestive system, New York

Sutili FJ, Kreutz LC, Norob M, Gresslerc LT, Heinzmann BM, Vargas AC, Baldisserotto B (2013) The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Veterinary Immunology and Immunopathology. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.11.009

Tarkhani R, Imani A, Jamali H, Farsani HG (2017) Anaesthetic efficacy of eugenol on various size classes of angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). Aquac Res 00:1–8. doi:10.1111/are.13339

Tavares-Dias M, Mariano WS (2015) Produção e reprodução de organismos aquáticos. Embrapa Amapá (CPAF-AP) 2:345

Tranquilli WJ, Thurmon JC, Gimm KA (2014) Anestesiologia e analgesia veterinária. 4 edn. Roca ISBN 9788541200080

Vidal LVO, Albinati RCB, Albinati ACL, Lira AD, Almeida TR, Santos GB (2008) Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. Pesquisa agropecuária brasileira 43:288-294. DOI:10.1590/S0100-204X2008000800017

Viegas EMM, Pimenta FA, Gonçalves LU, Durães JP, Ribeiro MAR, et al (2012) Slaughter methods and fish meat quality. Arch Zootec 61:41–50. ISSN 1885-4494

Vietmeyer ND (1976) Making aquatic weeds useful: some perspectives for developing countries. Washington, D.C., National Academy of Sciences, pp 15-21

Walter W (2017) Michaelis Dicionário Brasileiro da Língua Portuguesa. Editora Melhoramentos ISBN 978-85-0605-497-0

Weerd JHV, Komen J (1998) The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology 120:107–112. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10017-X

West G, Heard D, Caulkett N (2007) Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Blackwell Publishing, Iowa. ISBN 978-0-8138-2566-3

Zavala–Camin LA (1996) Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes. Maringá: Eduem, pp 123. ISBN : 85-85545-20-8

CAPÍTULO 2

Influência do eugenol, benzocaína e gelo sobre o bem-estar da carpa capim adulta (*Ctenopharyngodon idella*)

The influence of eugenol, benzocaine and ice water on welfare of adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

(Artigo a ser submetido para *Fish Physiology and Biochemistry*)

Resumo O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do eugenol, benzocaína e gelo sobre o bem-estar de carpas capim adultas (*Ctenopharyngodon idella*) durante processos sedativos, anestésicos e/ou eutanásicos. Foram utilizados 60 peixes adultos com peso médio de 743 ($\pm 6,2$) g. O delineamento experimental foi casualizado e os animais foram divididos em oito grupos: testemunha (GT), controle (CO), etanol 1,75 ml.L⁻¹ (ET), gelo 1,75 ml.L⁻¹ (GE), eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50), eugenol 250 mg.L⁻¹ (E250), benzocaína 100 mg.L⁻¹ (B100) e benzocaína 300 mg.L⁻¹ (B300). Todos animais passaram por período de aclimação de sete dias em sistema de recirculação. Animais de um mesmo aquário foram capturados simultaneamente e submetidos individualmente aos respectivos desafios (CO, ET, GE, E50, E250, B100 e B300) em câmaras de anestesia. Os estágios anestésicos foram subdivididos em 0, 1, 2, 3 e 4. Foi realizada coleta de sangue para análises bioquímicas, os animais foram eutanasiados por secção medular, biometrados e tiveram parte do fígado coletado para análises de glicogênio hepático. Observamos que os peixes do tratamento GE demoraram mais tempo para alcançar os estágios 1 e 2 (69s e 316s) quando comparados aos outros tratamentos (B100 – 31s e 58s; E50 – 25s e 55s; B300 – 17s e 35s; E250 19s e 40s respectivamente). Houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,01$) quanto ao tempo exigido para atingir os estágios anestésicos 3 e 4, contudo, GE foi o que requereu tempo mais longo (394s e 461s). Comparativamente, animais tratados com as menores doses dos anestésicos benzocaína e eugenol demandaram tempo mais longo para alcançar os estágios anestésicos 3 e 4 (E50 = 81s e 132s; B100 = 77s e 105s) do que nas concentrações mais elevadas (E250 = 43s e 62s; B300 = 42s e 57s). Como agentes sedativos e anestésicos, a benzocaína na concentração de 300 mg.L⁻¹ proporcionou a resposta

mais rápida, seguida do eugenol 250 mg.L⁻¹. Como agentes eutanásicos a benzocaína e o eugenol se mostraram eficazes. Em relação ao bem-estar, o grupo B100 apresentou as concentrações mais altas para as análises de glicose (141,8 ± 5,3 mg.dL⁻¹) e cortisol (187,2 ± 6,3 ng.mL⁻¹) (p<0,05). Embora a benzocaína na concentração 100 mg.L⁻¹ seja amplamente utilizada como anestésico em peixes, nosso estudo demonstrou esta como agente estressor para carpas capim adultas.

Palavras chave

Eugenol ◦ Benzocaína ◦ Bem-estar animal ◦ Carpa Capim ◦ Anestesia ◦ Peixe

Abstract The aim of this study was to evaluate the effect of eugenol, benzocaine and water ice on welfare during sedative, anesthetic and/or euthanasic processes in adult grass carps. Sixty adult fish were used, with a mean weight of 743.0 (± 6.2) g. The experimental design was randomized and the animals were divided into eight groups, according to the treatment to which they were submitted: witness group (WG), control (CO), ethanol 1.75 ml.L⁻¹ (ET), water ice (WI) eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50), eugenol 250 mg.L⁻¹ (E250), benzocaine 100 mg.L⁻¹ (B100) and benzocaine 300 mg.L⁻¹ (B300). All animals underwent a seven-day acclimation period in the recirculation system. The animals from the same aquarium were captured simultaneously and individually submitted to the respective challenges in anesthesia chambers. The anesthetic stages were subdivided into 0, 1, 2, 3 and 4 and the time to reach each stage was measured. Blood samples were collected for biochemical analysis and then the animals were euthanized by the medullary section. They were biometrically and had part of the liver collected for hepatic glycogen analysis. We observed that WI group (p <0.01) took longer to reach stages 1 and 2 (69s and 316s) when compared to the other treatments (B100 - 31s and 58s, E50 - 25s and 55s, B300 - 17s and 35s, E250s 19s and 40s respectively). There was a statistical difference between the groups (p <0.01) regarding the time required to reach the anesthetic stages 3 and 4, however, WI required the longest time (394s and 461s). Comparatively, animals treated with lower doses of benzocaine and eugenol anesthetics required longer time to reach anesthetics stages 3 and 4 (E50 = 81s and 132s; B100 = 77s and 105s) than in the higher concentrations (E250 = 43s and 62s; B300 = 42s and 57s). As sedatives and anesthetics, benzocaine at the concentration of 300 mg.L⁻¹ provided the fastest response, followed by eugenol 250 mg.L⁻¹. As

euthanasic agents, benzocaine and eugenol were effective. In relation to welfare, B100 group had the highest concentrations for glucose ($141.8 \pm 5.3 \text{ mg.dL}^{-1}$) and cortisol ($187.2 \pm 6.3 \text{ ng.mL}^{-1}$) ($p < 0.05$). Although benzocaine at 100 mg.L^{-1} concentration is widely used as an anesthetic in fish, our study demonstrated this as a stressor agent for adult grass carps.

Keywords:

Eugenol ◦ Benzocaine ◦ Animal Welfare ◦ Grass Carp ◦ Fish ◦ Anesthesia

Introdução

Nativa dos grandes lagos e rios da Ásia Oriental, a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) é considerada uma espécie de clima subtropical e temperado que tolera temperaturas entre $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $33 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Shireman e Smith, 1983; Cudmore e Mandrak, 2004). Herbívora e de fácil adaptação, a carpa capim foi amplamente introduzida pelo mundo com o intuito principal de controlar macrófitas aquáticas (Cross, 1969; George, 1982), e seu uso como controlador biológico prosperou devido à sua grande capacidade de consumo de matéria vegetal (Allen e Wattendorf, 1987). A carpa capim é espécie muito utilizada como modelo experimental por ser um animal que se adapta facilmente, entretanto não há na literatura dados quanto a doses anestésicas específicas para a espécie a serem utilizadas.

Existem alguns métodos anestésicos para peixes, dentre eles, a anestesia inalatória é uma técnica amplamente utilizada, por meio da qual o fármaco é diluído em meio aquoso e inalado pelo animal (Longley et al. 2008; Ross e Ross, 2008; Tranquilli et al. 2014). Dessa forma, as moléculas chegam rapidamente ao sangue arterial eferente e sistema nervoso central (Longley et al. 2008; Ross e Ross, 2008). Entretanto, o desafio dessa técnica é encontrar o equilíbrio entre a concentração adequada do anestésico escolhido e o plano anestésico desejado (West et al. 2007). Diferentes fatores intervenientes como espécie, idade, metodologia aplicada e fármaco eleito, fazem com que a anestesia em peixes tenha apenas uma fonte de embasamento inicial, devido a diversidade de fatores envolvidos (Ross e Ross, 2008; Grimm et al. 2015).

Os anestésicos podem ser utilizados com propósito de sedação, anestesia, ou em doses elevadas como agentes eutanásicos. Entretanto, a forma de abate comercial mais utilizada em peixes é o choque térmico com água e gelo, método não considerado humanitário (Viegas et al. 2012; Pedrazzani et al. 2009). Embora pesquisas relacionadas à sensibilidade em peixes sejam relativamente novas, este é um tema emergente e de preocupação mundial.

Em experimento realizado por Sneddon et al. (2003) com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), classificou como nociceptores (receptores da dor) 22 dos 58 receptores encontrados na cabeça desses animais, sugerindo que o peixe é sim suscetível à dor. Desta forma, é importante repensar o estresse aos quais estes animais são submetidos durante o manejo e abate, pois é sabido que o estresse nos peixes desencadeia respostas neuroendócrinas, gerando, a partir disso, respostas primárias, secundárias e/ou terciárias liberando catecolaminas e cortisol, que influenciam de forma negativa o crescimento, reprodução e o sistema imunológico (Iwama, 1998; Farrell, 2011; Martínez-Porchas et al. 2009; Papoutsoglou, 2012; Evans et al. 2014). Sendo assim, o uso de agentes anestésicos se justifica durante o manejo, transporte ou outras formas de manipulação, para evitar traumas, morbidades ou até mesmo a morte destes animais (West et al. 2007; Tarkhani et al. 2017).

Tendo em vista o reduzido número de estudos acerca do uso de anestésicos para manejo e/ou eutanásia que utilizam a carpa capim como modelo experimental, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança de diferentes agentes anestésicos em variadas concentrações nos estágios de anestesia desta espécie. Especificamente, foram analisados os efeitos do eugenol, benzocaína e gelo sobre o bem-estar durante processos sedativos, anestésicos e/ou eutanásicos em carpas capim adultas (*Ctenopharyngodon idella*).

Material e métodos

Foi realizado estudo experimental com peixes da espécie carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) no Laboratório de Pesquisas em Piscicultura (LAPEP, latitude -25.584121 S, longitude -49.221711 W), da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de de Animais (CEUA) da PUCPR e teve sua aprovação sob registro número 01107/2016.

Para a realização do estudo, foram utilizados 60 peixes adultos com idade aproximada de dois anos, peso médio de 743 ($\pm 6,2$) g, comprimento total médio de 39,72 ($\pm 0,02$) cm.

Aclimação

Provenientes de viveiros escavados do LAPEP (Figura 1), os peixes foram alocados de forma aleatória a um sistema de recirculação de água composto por doze aquários de aclimação (Figura 2) com volume útil de 400 L. (Figura 3) por sete dias. Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) nos tanques, foram mantidos por meio de aeração constante. Foram acondicionados sete peixes em cada aquário, e a qualidade da água foi monitorada diariamente, sendo verificados temperatura e oxigênio dissolvido com uso de oxímetro multiparâmetro (YSI®, modelo 85, Yellow Springs, EUA), pH com phmetro Hanna Instruments® modelo HI8424 (Woonsocket, EUA), e os níveis de amônia total e nitrito eram verificados com *kits Labcon Test*® (Camboriú, Brasil).

Os animais eram alimentados diariamente às 9h30min e 16h30min horas até a saciedade aparente com ração comercial Alisul Alimentos S.A.®, contendo 28% de proteína bruta. Folhas frescas de alfafa (*Medicago sativa*) cultivadas no LAPEP eram fornecidas uma vez ao dia (no período da tarde) até saciedade aparente. As sobras eram retiradas após decorridos 60 minutos do início da alimentação. Finalizado o período de aclimação, todos os peixes foram submetidos aos tratamentos, seguindo a distribuição em um grupo testemunha (n=6) e sete grupos tratamento. Antes da transferência dos peixes para as câmaras experimentais, os animais foram submetidos a um período de restrição alimentar (jejum) de oito horas.



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 1 – Captura dos peixes nos viveiros escavados



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 2 – Sistema de recirculação



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 3 – Aquário de aclimação

Protocolo Experimental

As sete câmaras de anestesia foram previamente preparadas com volume útil de 25 L de água cada uma para receber os peixes relativos a cada tratamento, mantidas sob oxigenação constante. A água utilizada foi retirada do sistema de recirculação.

Sete peixes foram capturados simultaneamente de um mesmo aquário de aclimação e distribuídos individualmente em cada uma das câmaras de anestesia (Figura 4) que compunham os sete tratamentos (ver item *Tratamentos*). Para cada tratamento, este procedimento foi realizado oito vezes ($n=8$), e o conteúdo das câmaras de anestesia renovado após cada análise comportamental. No aquário contendo gelo e água, foi monitorada a temperatura, de forma a mantê-la entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

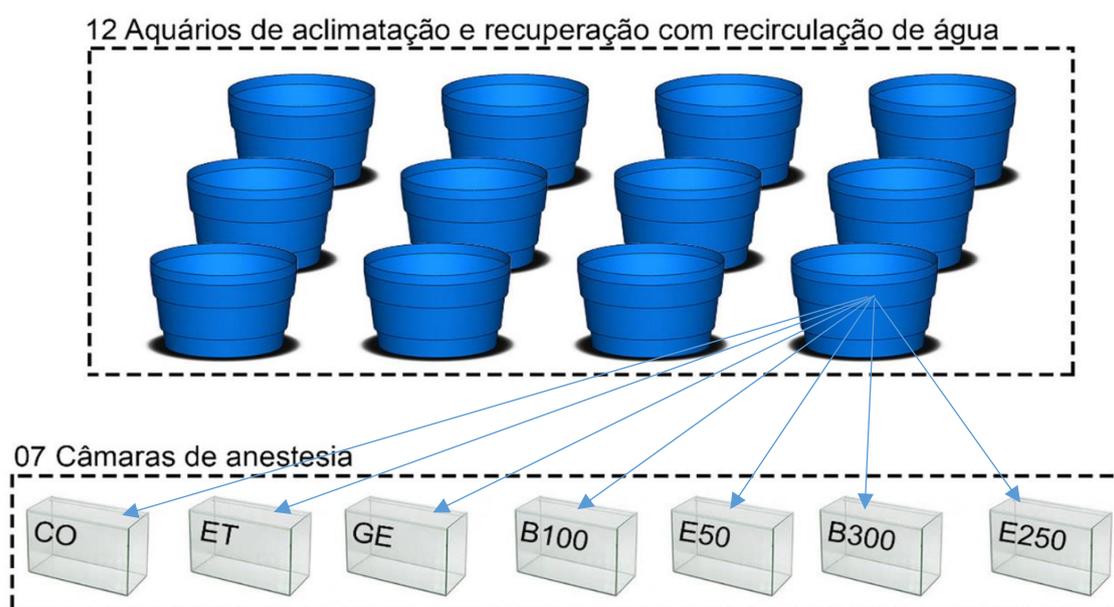


Figura 4 – Ilustração do esquema de distribuição dos animais retirados de um mesmo aquário de aclimação e simultaneamente distribuídos nas câmaras de anestesia. Este processo foi repetido oito vezes.

Preparo dos Anestésicos

Ambos os anestésicos foram diluídos em etanol, sendo o eugenol (Biodinâmica®, Ibiporã, Brasil), com índice de pureza entre 99 e 100%, diluído na proporção de 100 mL.L^{-1} , e o anestésico benzocaína (Sigma®, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 100 g.L^{-1} para preparo da solução estoque, que foram armazenadas em frasco âmbar previamente identificados.

Grupo Testemunha

Este grupo foi formado com o objetivo de se obterem dados basais da espécie quanto aos parâmetros bioquímicos (cortisol, glicose e glicogênio hepático), uma vez que na revisão realizada não se encontrou dados basais da carpa capim. Foram utilizados animais mantidos em um mesmo aquário de aclimatação, sem submetê-los às câmaras experimentais. Os peixes foram capturados com auxílio de rede, anestesiados até o estágio quarto em solução de benzocaína 100 mg.L⁻¹. O sangue foi imediatamente coletado por meio de punção da veia caudal e em seguida foram eutanasiados por secção medular. Uma amostra do fígado de cada animal foi coletada e congelada. O manejo se deu de forma rápida, a fim de diminuir a interferência e minimizar o estresse. Este grupo não aguardou o período necessário para a elevação de cortisol e glicose.

Tratamentos

A denominação dos grupos se deu de acordo com o tratamento utilizado nas câmaras de anestesia, sendo: Controle (CO) – apenas água, sem influência de agentes químicos ou térmicos; Grupo etanol (ET) – diluição de etanol na concentração de 1,75mL.L⁻¹ (média do etanol utilizado para a diluição dos anestésicos); Grupo gelo (GE) – gelo misturado à água na proporção de 2:1; Grupo benzocaína 100 (B100) – diluída em água na concentração de 100 mg.L⁻¹; Grupo benzocaína 300 (B300) – diluída em água na concentração de 300 mg.L⁻¹; Grupo eugenol 50 (E50) – diluído em água na concentração de 50 mg.L⁻¹; Grupo eugenol 250 (E250) – diluído em água na concentração de 250 mg.L⁻¹. As concentrações foram escolhidas com base em outras espécies, incluindo a carpa comum dado que há carência de dados sobre a carpa capim (Allen, 1988; Gilderhus, 1989; Gilderhus, 1990; Hayton et al. 1996; Gomes et al. 2001; Gontijo et al. 2003; Velisek et al. 2005; Inoue et al. 2011; Yamanaka et al. 2011; Akbulut et al. 2012; Bittencourt et al. 2012; Gause et al. 2012; Souza et al. 2012; Bernardes Júnior, 2013; Fabiani et al. 2013; Rocha, 2015).

Os animais que compuseram os tratamentos foram capturados dos aquários de aclimatação, transferidos para as câmaras de anestesia respectivas a cada tratamento, observados quanto a análises comportamentais. Os grupos CO, ET, GE, B100 e E50 voltaram aos aquários de aclimatação por 20 minutos para que se pudesse verificar os parâmetros de cortisol e glicose pós estresse. Após este

período, foram realizadas coletas de sangue. Após a eutanásia foram retiradas amostras de fígado.

Análise Comportamental

Para avaliação das características comportamentais dos peixes foi realizado previamente um piloto, onde toda a equipe envolvida na observação foi meticulosamente preparada para a realização dos testes inter e intra observador até o nível de reconhecimento de todos os estágios anestésicos. Este piloto também foi importante para a escolha das doses utilizadas, garantindo que mesmo nas concentrações mais elevadas dos fármacos, todos os estágios anestésicos fossem passíveis de observação. Como padronização foram utilizados cinco estágios anestésicos, conforme descritos por Tranquilli et al. (2014) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estágios anestésicos progressivos em peixes teleósteos considerados na análise comportamental. Cada estágio tem respostas comportamentais e/ou fisiológicas específicas e padronizadas.

Estágio	Denominação	Descrição dos sinais
Estágio 0 (E0)	Normal	Reage aos estímulos externos; respiração opercular normal
Estágio 1 (E1)	Sedação leve	Respiração opercular diminuída; Respostas visual e aos estímulos táteis diminuídas
Estágio 2 (E2)	Sedação profunda	Reage contra estímulos maiores
Estágio 3 (E3)	Anestesia superficial	Perda de coordenação e tônus muscular; reage somente contra estímulos táteis fortes
Estágio 4 (E4)	Anestesia profunda	Hiporreatividade e arreflexia; redução dos movimentos operculares
Estágio 5 (E5)	Depressão bulbar	Parada opercular; morte;

Fonte: Tranquilli et al., 2014, modificado.

Com auxílio de cronômetro digital, foi observado o intervalo de tempo entre a alocação do animal à câmara de anestesia e o início da manifestação observável dos sinais correspondentes à cada estágio anestésico para respectiva tomada de nota. Para a verificação da reação aos estímulos táteis foram utilizados bastões de vidro. Os animais submetidos a concentrações anestésicas mais altas (B300 e E250), atingiram o estágio cinco e permaneceram no aquário (Figura 5) por um total de dez minutos. Após este período os peixes não retornaram da anestesia, fato comprovado pela alocação destes animais em aquários com água pelo intervalo de 60 minutos (mortalidade 100%). Animais submetidos as demais concentrações foram expostos até atingirem o E4, para então serem transferidos imediatamente aos aquários de aclimatação do sistema de recirculação preparados para esta finalidade, e neles mantidos por 20 min, tempo de espera necessário para aferir os níveis de cortisol (Koakoski, 2012).



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 5 – Animais submetidos as concentrações mais altas de eugenol e benzocaína após alcançarem o estágio 5.

Biometria e coleta de amostras

Amostras de sangue dos animais foram coletadas por meio de punção da veia caudal, com auxílio de seringa de 3 mL e agulha (7mmx25mm) descartáveis (Figura 6). O sangue foi fracionado em três microtubos de centrífuga, um deles contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) fluoretado, para extração de plasma e dois tubos secos para extração de soro.

Após a eutanásia, os animais foram identificados por meio de etiqueta plastificada (Figura 7) e biometrados (comprimento total e parcial aferidos por meio de ictiômetro e pesados em balança digital marca Filizola®, modelo NF3). Para coleta

de amostras de fígado, foi realizada antissepsia da porção ventral dos peixes, utilizando-se de gaze e álcool 70%. A cavidade abdominal foi exposta através de incisão longitudinal na porção ventral com uso de tesoura cirúrgica romba-fina. As paredes da cavidade foram rebatidas lateralmente e parte do fígado foi coletado, identificado (Figura 8) e congelado imediatamente a -20 °C.



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 6 – Coleta de sangue da veia caudal.



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 7 – Identificação dos animais por meio de etiquetas plastificadas.



Fonte: Beatriz Gneiding

Figura 8 – Fragmento do fígado identificado e congelado.

Análises Bioquímicas

A análise dos níveis plasmáticos de glicose foi realizada pelo método de glucose-oxidase, utilizando-se o *kit Glicose Liquiform Vet®* (Labtest; Lagoa Santa, Brasil). Os níveis de cortisol no soro foram determinados com uso do *kit DRG Cortisol ELISA EIA – 1887®* (DRG International; Mountainside, EUA). Os níveis de glicogênio hepático foram determinados conforme protocolo descrito por Moon et al. (1989).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statgraphics® Centurion versão XVI (Statgraphics, 2010) e considerando o nível de significância mínimo de 5% ($p \leq 0,05$). As médias foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey (quando da ocorrência de homogeneidade de variância, avaliada pelo teste de Levene). Para os dados de tempo de indução (com variância não homogênea), foi utilizado o teste de Fisher, e o *fator de condição* (K) ($K = 100 \times [\text{peso médio final} / \text{comprimento médio total final}^3]$) utilizado como cofator (devido a não homogeneidade de peso e comprimento dos peixes).

Resultados

Parâmetros da água

Durante o período de aclimação de sete dias, os parâmetros físicos e químicos da água se mantiveram dentro dos níveis recomendados, apresentando médias de oxigênio dissolvido 7,1 ($\pm 0,3$) mg.L⁻¹, temperatura 20,4 °C ($\pm 0,9$), pH entre 7,6 e 7,8, concentração de amônia total 0,0 mg.L⁻¹ e concentração de nitrito de 0,04 \pm 0,09 ppm.

Sedação, anestesia e eutanásia

Ao se considerarem os estágios anestésicos determinados pela análise comportamental dos peixes nas câmaras de anestesia, houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre o grupo GE e os outros tratamentos no E1 (sedação leve) e E2 (sedação profunda). Já no E3 (anestesia superficial) e no E4 (anestesia profunda) (Figura 9), houve diferença entre os grupos ($p < 0,01$). A taxa de sobrevivência nos grupos GT, CO, GE, ET, B100 e E50 foi de 100%.

Os tempos decorridos para que os animais atingissem os estágios E1, E2, E3 e E4 foram: GE – 69 s, 316 s, 394 s, 461 s respectivamente; B100 – 31 s, 58 s, 77 s, 105 s respectivamente e E50 – 25 s, 55 s, 81 s, 132 s respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos B300 e E 250 ($p = 0,50$), submetidos a altas concentrações de fármaco por período prolongado com propósito de eutanásia, sendo para B300 75,97 ($\pm 0,71$) segundos e E250 81,30 ($\pm 0,71$) segundos. O tempo para alcançar os estágios E1, E2, E3, E4 e E5 para estes grupos foram: B300 – 17 s, 35 s, 42 s, 57 s, 74 s respectivamente e E250 – 19 s, 40 s, 43 s, 62 s, 84 s respectivamente.

O intervalo de tempo decorrido entre os estágios E1 e E2 se mostrou diferente entre o grupo GE e os demais grupos ($p = 0,0$). Já os intervalos entre E2 / E3 e E3 / E4 apresentaram diferenças entre os grupos ($p = 0,0$). Os intervalos entre E4 e E5 para os grupos E250 e B300 não apresentou significância ($p = 0,9$). As médias dos grupos são apresentadas na Figura 10.

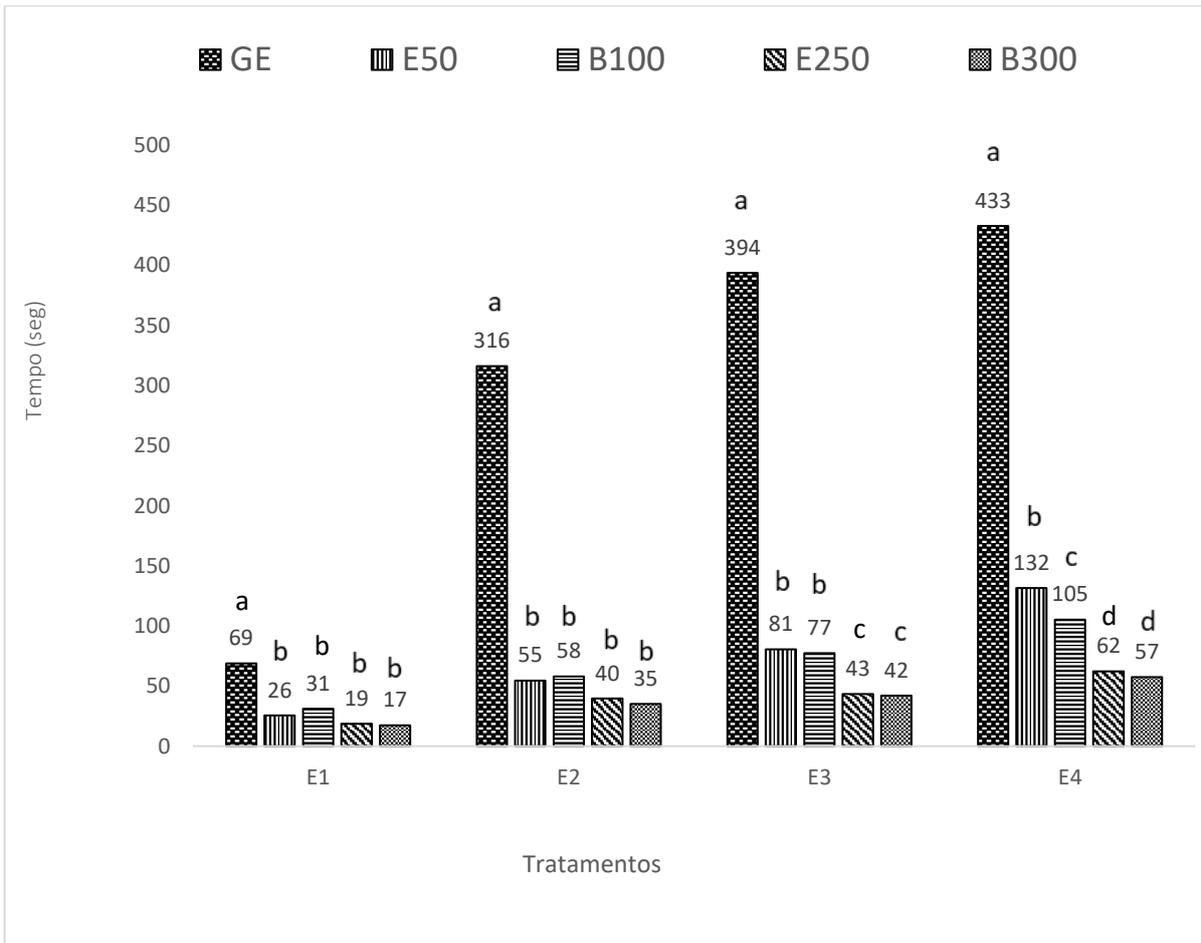


Figura 9 – Tempo (segundos) para os animais alcançarem cada um dos estágios anestésicos - Sedação leve (E1), sedação profunda (E2), anestesia superficial (E3), anestesia profunda (E4) dentro de cada tratamento preferido (GE: água e gelo, B100: benzocaína 100 mg L⁻¹, B300: 300 mg L⁻¹, E50: eugenol 50 mg L⁻¹ e E250: eugenol 250 mg L⁻¹). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre os tratamentos (p<0,01).

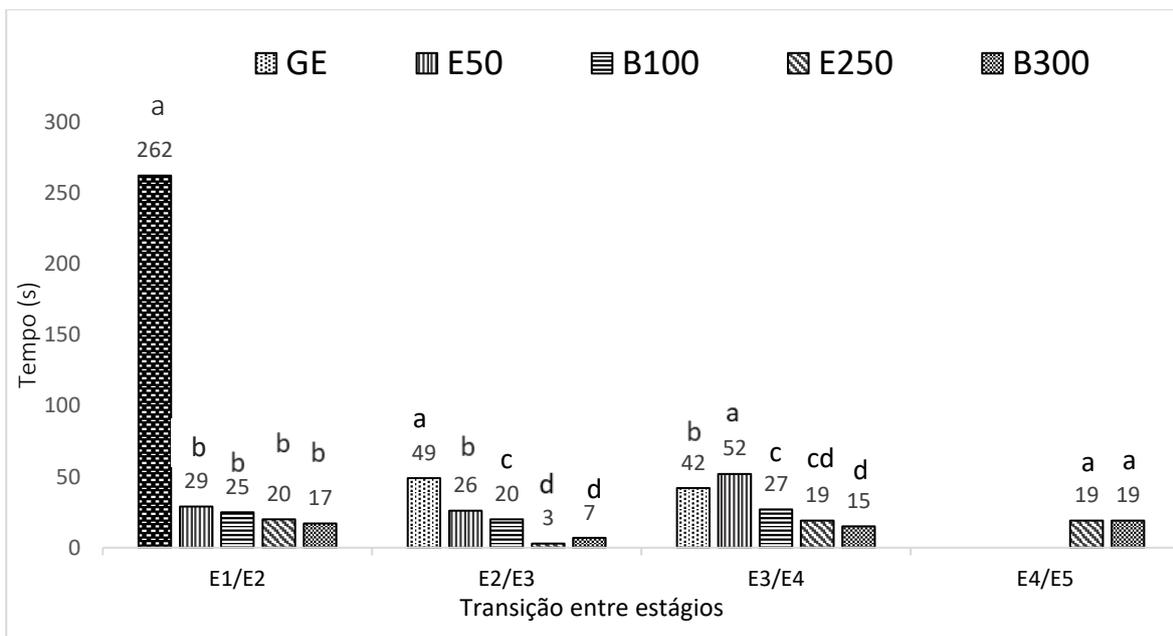


Figura 10 – Tempo (segundos) requerido pelos grupos para passar de um estágio para outro, sendo do estágio 1 para o estágio 2 (E1/E2), do estágio 2 para o estágio 3 (E2/E3), do estágio 3 para o estágio 4 (E3/E4) e nas doses maiores (B300 e E250) do estágio 4 para o estágio 5 (E4/E5) - Sedação leve (E1), sedação profunda (E2), anestesia superficial (E3), anestesia profunda (E4) e morte (E5). Os grupos avaliados foram (GE: água e gelo, B100: benzocaína 100 mg L⁻¹, B300: 300 mg L⁻¹, E50: eugenol 50 mg L⁻¹ e E250: eugenol 250 mg L⁻¹). Letras minúsculas diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre os tratamentos (p≤0,00).

Análises Bioquímicas

Os resultados das análises bioquímicas das amostras correspondentes aos tratamentos GT, CO, GE, ET, B100 e E50, nos quais os peixes não foram submetidos à eutanásia química, mostraram que houve diferença estatística significativa nos níveis de glicose plasmática entre os tratamentos (Tabela 2). Os níveis de cortisol sérico entre os tratamentos foram diferentes significativamente, sendo o nível mais alto observado no grupo benzocaína 100 (Tabela 3).

Tabela 2 – Concentrações de glicose plasmática (mg.dL⁻¹) das carpas capim submetidas a diferentes tratamentos - grupo testemunha (GT); grupo controle (CO); grupo água e gelo (GE); grupo etanol (ET); grupo eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50) e grupo benzocaína 100 mg.L⁻¹ (B100).

Glicose	Média ± SE
GT	83,24 ± 5,04 ^d
CO	102,85 ± 2,63 ^{cd}
GE	109,46 ± 4,22 ^{bc}
ET	115,21 ± 6,77 ^{bc}
B100	141,82 ± 5,26 ^a
E50	130,36 ± 4,96 ^{ab}

Letras diferentes entre linhas indicam diferenças significativas entre as médias de concentrações de glicose entre tratamentos (p<0,05).

Tabela 3 – Concentrações de cortisol sérico (ng.mL⁻¹) das carpas capim submetidas a diferentes tratamentos - grupo testemunha (GT); grupo controle (CO); grupo água e gelo (GE); grupo etanol (ET); grupo eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50) e grupo benzocaína 100 mg.L⁻¹ (B100).

Cortisol	Média ± SE
GT	83,78 ± 5,08 ^c
CO	144,67 ± 6,38 ^b
GE	133,18 ± 3,16 ^b
ET	137,65 ± 5,59 ^b
B100	187,19 ± 6,33 ^a
E50	144,97 ± 6,21 ^b

Letras diferentes entre linhas indicam diferenças nas concentrações de cortisol por tratamento (p<0,05).

Não houve alteração significativa ($p=0,59$) dos valores de glicogênio hepático (percentual) entre os grupos. Grupo testemunha (GT) 8,3 ($\pm 0,7$); grupo controle (CO) 7,6 ($\pm 0,6$); grupo água e gelo (GE) 7,9 ($\pm 0,4$); grupo etanol (ET) 7,2 ($\pm 0,5$); grupo eugenol 50 mg.L⁻¹ (E50) 7,4 ($\pm 0,5$) e grupo benzocaína 100 mg.L⁻¹ (B100) 6,3 ($\pm 0,9$).

Discussão

Durante o período de aclimação, os parâmetros da água se mantiveram estáveis, encontrando-se dentro dos valores recomendados por Arana (1997) e Graeff (2000), mantendo desta forma os peixes em condições apropriadas, promovendo o bem-estar durante o período do experimento.

Pensando em bem-estar, observa-se que um dos meios amplamente utilizados para o abate de peixes cultivados é o choque térmico com água e gelo (Viegas et al. 2012). Neste estudo ficou constatado o longo tempo demandado pelo tratamento GE com mistura de gelo e água (2x1) para que promovesse ação anestésica sobre a carpa capim, quando comparado aos anestésicos benzocaína e eugenol. Verificou-se que os peixes submetidos ao gelo (GE) levaram mais tempo para alcançar todos os quatro estágios anestésicos quando comparados aos peixes dos demais grupos com o mesmo propósito. Enquanto mantidos na câmara de anestesia, os animais do GE demonstraram sofrimento aparente, debatendo-se, abrindo e fechando a boca e com hiperventilação causada pela rápida abertura e fechamento do opérculo em frequência acima de uma vez por segundo, principalmente até alcançar o segundo estágio de anestesia, quando então diminuía a frequência em razão da queda do metabolismo (paralisia fria). Segundo Viegas et al. 2012, o uso desse procedimento se mostra estressante e até mesmo ineficaz na insensibilização que precede o abate, dependendo da espécie. Poli et al. (2005) observaram expressiva diferença relacionada ao tempo de insensibilização em gelo, podendo esta diferença ocorrer na mesma espécie ou entre espécies, a saber: truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) entre 28 min e 198 minutos; salmão (*Salmo salar*) aproximadamente 60 min; turbot (*Psetta maxima*) aproximadamente 20 min; dourada (*Sparus aurata*) entre 20 e 40 min; robalo (*Dicentrarchus labrax*) 20 min e enguia (*Anguilla anguilla*) com cerca de 12 min.

Para manejo em sistema de produção ou para abate humanitário e eutanásia em condições experimentais, uma alternativa à utilização do gelo, é o uso de anestésicos, comumente utilizados para outros vertebrados (Longley et al., 2008; Neiffer e Stamper, 2009; Fabiani et al., 2013; Bernardes Júnior et al., 2013). Dentre os anestésicos utilizados no presente estudo, observamos que os animais submetidos à benzocaína na concentração de 100 mg.L⁻¹ apresentaram menor intervalo de tempo para alcançar os três primeiros estágios anestésicos e maior para alcançar o quarto estágio. Comparativamente, Gomes et al. (2001), trabalhando com juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), obtiveram respostas mais rápidas nos três primeiros estágios de anestesia, e mais longas para atingir o quarto estágio, quando utilizada a benzocaína na concentração 100 mg.L⁻¹, padrão de resposta semelhante ao observado neste trabalho. Quanto a resposta para alcançar o quarto estágio utilizando benzocaína na concentração 100 mg.L⁻¹, Ferreira et al. (1979) utilizando carpa comum, alcançaram em 72 s o estágio quatro, comparados com os 105 s deste trabalho. As diferenças encontradas no tempo de indução podem ser devido as diferentes respostas de cada espécie e fase de vida. Assim, a idade e peso do peixe, são fatores que também devem ser considerados no processo de anestesia com benzocaína.

Quando utilizado o eugenol na concentração de 50 mg L⁻¹, no presente trabalho, revelou grande intervalo de tempo para alcançar os estágios anestésicos, sobretudo entre o estágio três e quatro e para alcançar o quarto estágio. Esses achados contrastam com os de Tarkhani et al. (2017), em estudo com acará bandeira (*Pterophyllum scalare*), que obteve indução com eugenol até o estágio quatro em doses baixas (7,5 mg.L⁻¹) a partir de 55 segundos, sugerindo desta forma, que o tempo de exposição do fármaco em baixas concentrações pode variar com o peso e a espécie do peixe. Já Cunha et al. (2010) em experimento com juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), não obtiveram evidências anestésicas após 30 minutos de exposição ao eugenol nas concentrações de 5 e 10 mg.L⁻¹, já com a concentração de 50 mg L⁻¹ atingiu-se o estágio quatro em 111 segundos. No trabalho de Perdikaris et al. (2010), com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), utilizando eugenol na concentração de 50 mg.L⁻¹ o estágio quatro foi atingido em 120 segundos, comparados aos 132 segundos obtidos no presente trabalho, sugerindo que o eugenol na concentração de 50 mg.L⁻¹ apresenta resultados de anestesia similares, independente da idade ou espécie.

Quando comparados entre si, benzocaína na concentração de 100 mg.L⁻¹ demandou menos tempo para passar de um estágio para outro (E1/E2 – 25 s, E2/E3 – 20 s e E3/E4 – 27s), enquanto o eugenol na concentração de 50 mg L⁻¹, demandou um pouco mais de tempo entre os dois primeiros estágios e do terceiro para o quarto quase o dobro do tempo (E1/E2 – 29 s, E2/E3 – 26 s e E3/E4 – 52 s) demonstrando que para a carpa capim, a concentração de eugenol deve ser superior a 50 mg L⁻¹, e que a benzocaína concentração de 100 mg.L⁻¹ foi mais efetiva.

O uso de benzocaína na concentração de 300 mg.L⁻¹ promoveu a passagem pelos quatro estágios anestésicos em intervalos de tempo relativamente curtos (17, 7, 15 e 19 segundos respectivamente), porém passíveis de observação. Dados semelhantes aos observados com o eugenol em sua concentração mais elevada de 250 mg.L⁻¹ (20, 3, 19 e 11 segundos respectivamente). Contudo, observou-se resposta mais rápida do segundo para o terceiro estágio e mais lenta do terceiro para o quarto quando comparada a B300. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos B300 e E250, submetidos a altas concentrações de fármaco por período prolongado com propósito de eutanásia, mostrando que ambos são eficazes. As concentrações mais altas de anestésicos utilizadas como indutores promoveram visivelmente mais conforto aos peixes, desta forma, proporcionando bem-estar positivo quando comparado a indução com as doses mais baixas, contudo mais estudos acerca de indução com doses maiores e manutenção com doses padronizadas para a espécie são necessárias.

A determinação para atingir o tempo de estágio cinco, dos animais eutanasiados com altas concentrações de anestésicos, são importantes para determinar a viabilidade do uso destes como agentes eutanásicos. Considerando-se os dados obtidos em relação ao estresse promovido nas concentrações mais baixas desses dois anestésicos, o eugenol pode ser o mais apropriado para a sedação e anestesia de carpa capim adulta, embora, novos estudos são necessários a fim de se determinar a concentração anestésica ideal.

A resposta ao estresse dos animais foi avaliada a partir dos dados de glicemia plasmática e de cortisol sérico, sendo que, a glicose plasmática (mg.dL⁻¹) atingiu seu nível mais alto nos animais tratados com benzocaína 100 mg.L⁻¹. Dados de Gomes et al. (2001), utilizando tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos a concentrações superiores a 200 mg.L⁻¹ de benzocaína apontaram índices glicêmicos mais elevados, indicando tal anestésico como mais estressante. As carpas capim

tratadas com benzocaína 100 mg.L⁻¹ também foram as que apresentaram os dados mais elevados de cortisol sérico entre todos os tratamentos, indicando condições de estresse agudo mais acentuadas. Isto se contrapõe aos argumentos usualmente utilizados literatura, onde afirmam que o uso de anestésicos promovem o bem-estar, diminuem o estresse e evitam picos elevados de cortisol (Longley et al., 2008; Neiffer e Stamper, 2009; Fabiani et al., 2013; Bernardes Júnior et al., 2013), pois ficou evidente neste trabalho que nem todos os anestésicos podem ser considerados desta forma, assim a não generalização é fundamental quando se busca tais condições.

Animais tratados com eugenol 50 mg.L⁻¹, apresentaram segundo nível mais elevado de glicose. Este resultado difere dos encontrados na literatura com outras espécies. Iversen et al. (2003) em seu experimento com salmão (*Salmo salar*) não observaram aumento dos níveis de glicose em diferentes concentrações de eugenol. Inoue et al. (2005) utilizando o matrinxã (*Brycon cephalus*), relataram que o uso do eugenol impediu o aumento dos índices glicêmicos relacionados a situações de estresse. Neste estudo evidenciou aumento do cortisol no grupo E50 em curtos períodos de exposição, contrastando os dados encontrados por Small (2003) em seu experimento utilizando o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), que não observou aumento dos níveis de cortisol nos peixes anestesiados com eugenol, mesmo por período prolongado (30 minutos). Já Davis et al. (2015) obtiveram níveis de cortisol mais baixos em peixes zebra (*Danio rerio*) eutanasiados com eugenol quando comparado com o anestésico MS-222, ou metassulfonato de triclaína. As diferenças encontradas se devem provavelmente as respostas à dose utilizada, bem como a resposta específica de cada espécie, sendo necessários mais estudos para melhor elucidação das fontes de variação.

Como não foram encontrados dados basais de cortisol da carpa capim na literatura, Barton e Imawa (1991), citam em seu trabalho referências para carpa comum (*Cyprinus carpio*) de valores basais pré estresse entre 70 e 120 ng.mL⁻¹ e pós estresse entre 120 e 360 ng.mL⁻¹. Em nosso trabalho a média de valores basais encontrada foi de 84 ng.mL⁻¹.

O tratamento gelo e água não promoveu índices elevados de glicose plasmática e cortisol sérico na carpa capim deste estudo, o que corrobora com os dados encontrados por Ribas et al. (2007) em estudo com linguado (*Solea senegalensis*), que não evidenciaram aumento significativo nos índices de glicemia

e cortisol nos animais submetidos à insensibilização com gelo. Entretanto, a diminuição do metabolismo em decorrência da baixa temperatura possivelmente influencia a liberação dos hormônios primários do estresse. Desta forma, a obtenção de dados para aferir o estresse em animais submetidos a esse tipo de procedimento deva ser diferenciado, não utilizando dados de concentração de metabólitos, mas de parâmetros de respostas como batimento cardíaco ou indicadores de função cerebral. Entretanto, Ellis et al. (2012) sugerem a utilização de métodos para a verificação da ativação do eixo HPI, como por exemplo, o conteúdo de ACTH pituitário. Nossos dados corroboram com o estudo realizado por Scherer et al. (2005), no qual carpas capim imersas em água e gelo apresentaram movimentos aversivos durante o primeiro minuto, que se cessaram somente após dez minutos em virtude da paralisia fria, demonstrando desta forma, que apesar de não haver aumento dos indicadores bioquímicos de estresse (glicose e cortisol), os peixes estavam em sofrimento aparente, e que novos estudos acerca do estresse causado por este método de imobilização e abate de peixes são necessários para possibilitar repensar sobre o bem-estar dos mesmos.

Os dados de glicogênio hepático obtidos neste experimento não demonstraram diferença significativa entre os grupos. Morales et al. (1990) em experimento com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram redução significativa dos percentuais de glicogênio hepático nos primeiros trinta minutos, após este período os valores aumentaram acima dos valores basais. Entretanto, alegam que os dados publicados sobre as reservas de glicogênio hepático são contraditórios, pois, encontraram dados que corroboravam com seu trabalho, bem como, dados onde após estresse não foi evidenciado diminuição no glicogênio hepático (Leach e Taylor, 1980), assim como em nosso experimento. Nas situações de estresse, estes níveis de glicogênio estariam relacionados à glicose plasmática pela gliconeogênese e/ou glicogenólise. As catecolaminas mobilizam o glicogênio e podem induzir a glicogenólise inicial. Entretanto é necessário entender como e em que momento estas reservas são utilizadas (Morales et al. 1990). Desta forma, mais estudos se fazem necessários a fim de esclarecer esta lacuna.

Conclusão

Com o aumento do consumo de proteína de peixe, bem como da utilização de peixes como modelo experimental em pesquisas, faz-se necessário repensar a forma de anestesia e abate desses animais, com vista à promoção do bem-estar. Em nosso estudo, o grupo gelo (GE) demonstrou ser, para todos os estágios anestésicos, o menos eficaz, de forma a exigir que o animal permaneça exposto por longos períodos para se obter resposta satisfatória. Como agentes sedativos e anestésicos, a benzocaína na concentração de 300 mg.L⁻¹ (B300) porcionou a resposta mais rápida, seguida do eugenol 250 mg.L⁻¹ (E250). Como agentes eutanásicos a benzocaína (B300) e o eugenol (E250) se mostraram eficazes.

A benzocaína na concentração de 100 mg.L⁻¹ demandou menos tempo para passar de um estágio para outro (E1/E2, E2/E3 e E3/E4) quando comparada ao eugenol na concentração de 50 mg L⁻¹, demonstrando que para a carpa capim, a concentração de eugenol deve ser superior a 50 mg L⁻¹, e que a benzocaína na concentração de 100 mg.L⁻¹ foi mais efetiva. A benzocaína na concentração 100 mg.L⁻¹ (B100) é amplamente utilizada na pesquisa, e neste estudo foi o grupo que apresentou maior nível de cortisol e glicose, demonstrando ser agente estressor para carpas capim adultas.

Tomados em conjunto, os dados obtidos reforçam a necessidade de se identificarem as condições ideais de anestesia para cada espécie, visando a minimização do estresse, seja para manejo, abate comercial, humanitário ou eutanásia.

Referências

Allen JL (1988) Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. *The Progressive Fish-Culturist* 50:59-60. Doi: 10.1577/1548-8640(1988)050<0059:ROBIRT>2.3.CO;2

Allen SK, Wattendorf RJ (1987). Triploid grass carp: status and management implications. *Fisheries* 12:20-24. doi:10.1577/1548-8446(1987)012<0020:TGCSAM>2.0.CO;2

Arana LV (1997) Princípios químicos em qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis. Editora da UFSC. ISBN 8532800823

Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 3-26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G

Bernardes Júnior JJ, Nakagome FK, Mello GL, Garcia S, Júnior HA (2013) Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 1140-1144. doi: 10.1590/S0100-204X2013000800049

Akbulut B, Çakmak E, Özel OT, Dülger N (2012) Effect of Anaesthesia with Clove Oil and Benzocaine on Feed Intake in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii Brandt*, 1869). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12: 667-673. Doi: 10.4194/1303-2712-v12_3_15

Bittencourt F, Souza BE, Boscolo WR, Rorato RR, Feiden A, Neu DH (2012) Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64:1597-1602. doi:10.1590/S0102-09352012000600028

Cross DG (1969) Aquatic weed control using grass carp. *J Fish Biol* 1:27-30. doi: 10.1111/j.1095-8649.1969.tb03842.x

Cudmore B, Mandrak NE (2004) Biological synopsis of grass carp (*Ctenopharyngodon della*). Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences, pp 44. ISSN: 0706-6473

Cunha MA, Zeppenfeld CC, Garcia LO, Loro VL, Fonseca MB, Emanuelli T, Veeck APL, Copatti CE, Baldisserotto B, (2010) Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*, 40:2107-2114. doi.org/10.1590/S0103-84782010005000154

Davis DJ, Klug J, Hankins M, Doerr HM, Monticelli SR, Song A, Gillespie CH, Bryda EC (2015) Effects of clove oil as a euthanasia agent on blood collection efficiency and serum cortisol levels in *Danio rerio*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Vol 54, No 5.

Ellis T, Yildiz HY, Lo´pez-Olmeda J, Spedicato M T, Tort L, Øverli Ø, Martins CIM (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem* 38:163–188 DOI 10.1007/s10695-011-9568-y

Evans DH, Claiborne JB, Currie S (2014) *The Physiology of Fishes*. CRC Press. Boca Raton. ISBN 10: 1439880301

Fabiani BM, Boscolo WR, Feiden A, Diemer O, Bittencourt F, Neu DH (2013) Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brycon hilarii*. *Acta Scientiarum* 35:113. doi: 10.4025/actascianimsci.v35i2.16644

Ferreira JT, Smit GL, Schoonbee HJ, Holzapfel CW (1979) Comparison of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and mS-222 in two freshwater fish species. *The Progressive Fish-Culturist*, 41:3, 161-163. DOI: 10.1577/1548-8659(1979)41[161:COAPOB]2.0.CO;2

Farrell AP (2011) *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Elsevier Inc, Amsterdam. ISBN: 978-0-12-374545-3

Gilderhus PA (1989) Efficacy of Benzocaine as an anesthetic for salmonid fishes. North American Journal of Fisheries Management 9:150-153. Doi: 10.1577/1548-8675(1989)009<0150:EOBAAA>2.3.CO;2

Gilderhus PA (1990) Benzocaine as a fish anesthetic: efficacy and safety for spawning-phase salmon. The Progressive Fish-Culturist 52:189-191. Doi: 10.1577/1548-8640(1990)052<0189:BAAFAE>2.3.CO;2

Gomes LC, . Chipari-gomes A R, Lopes NP, Roubach R, Araujo-Lima CARM (2001) Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Journal of the World Aquaculture Society, Vol. 32, No. 4. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x

Gontijo AMMC, Barreto RE, Speit G, Reyes VAV, Volpato GL, Salvadori DMF (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. Mutation Research (534) 165–172. Doi 10.1016/S1383-5718(02)00276-0

Graeff A, Pruner E N (2000) Efeito da Densidade de Povoamento na Produtividade Final em Carpas (*Cyprinus carpio var specularis*) em Fase de Engorda, durante o Verão. Rev. Bras. Zootec., 29(3):639-645 dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000300001

Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA (2015) Veterinary anesthesia and analgesia, 4edn. Blackwell, Iowa ISBN-10: 1118526236

Hayton WL, Szoke A, Kemmenoe BH, Vick AM, (1996) Disposition of benzocaine in channel catfish. Aquatic Toxicology (36) 99-113. Doi: 10.1016/S0166-445X(96)00792-8

Iwama GK (1998) Stress in fish. Annals of the New York Academy of Sciences 851:304-310. DOI:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x

Inoue LAKA, Afonso LOB, Iwama GK, Moraes G (2005) Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. Acta Amazonica. VOL. 35(2): 289 – 295. dx.doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018

Inoue LAKA, Boijink CL, Ribeiro PT, Silva AMD, Affonso EG (2011) Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. Acta Amazonica vol. 41(2): 327 – 332. Doi: 10.1590/S0044-59672011000200020

Iversen M, Finstada B, McKinleyc RS, Eliassenb RA (2003) The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture 221 549–566. doi:10.1016/S0044-8486(03)00111-X

Koakoski G, Oliveira TA, Gabriel J, Fagundes M, Kreutz LC, José L, et al (2012) Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. Physiol Behav 106:129–32. doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.013

Leach GL, Taylor MH (1980) The role of cortisol in Stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology 42, 219-227. Doi: 10.1016/0016-6480(80)90191-4

Longley L, Fiddes M, O'Brien M (2008) Anaesthesia of exotic pets. Elsevier, London, pp 314 ISBN-13: 978-0702028885

Martínez-Porchas M, Martínez CLR, Ramos ER (2009) Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences 4:158-178. doi:10.1093/icb/42.3.517

Moon T W, Foster G D, Plisetskay E M (1989) Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 week. Can. J. Zool. 67, 2189-2193.

Morales AE, Garcia-Rejón L, Higuera M (1990) Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout effects on liver primary metabolism. *Cony. Biochem. Physiol.* Vol. 95A. No. 1, pp. 87-93. Doi: 10.1016/0300-9629(90)90014-J

Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *Ilar Journal* 50:343-360. ISSN:1084-2020

Papoutsoglou SE (2012) Textbook of fish endocrinology. Nova Science Publishers, New York. ISBN: 978-1-62100-376-2

Pedrazzani AS, Carneiro PCF, Kirschnik PG (2009) Impacto negativo de secção de medula e termonarcose no bem-estar e na qualidade da carne da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10:188-197. doi:10.1590/1678-457x.05616

Perdikaris C, Nathanailides C, Gouva E, Gabriel UU, Bitchava K, Athanasopoulou F, Paschou A, Paschos I (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and Goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). *Acta Vet. Brno* 2010,79: 481-490; doi: 10.2754/avb201079030481

Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G (2005) Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13: 29–49. doi:10.1007/s10499-004-9035-1

Rocha AF, Stech MR, Pinheiro MFM, Pagani D M, Sukekava CF (2015) Use of eugenol as anaesthetic for *Geophagus brasiliensis* juveniles. *Boletim do instituto da pesca* 41:697–705. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2799

Ross LG, Ross B (2008) Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3 edn. Blackwell Publishing, Oxford. ISBN 978-1-4051-4938-9

Scherer R, Augusti PR, Steffens C, Bochi VC, Hecktheurer LH, Lazzari R, Radunz-Neto J, Pomblum SCG, Emanuelli T (2005) Effect of slaughter method on postmortem changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) stored in ice. J Food Sci, 70: 348-353. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09965.x

Shireman JV, CR Smith (1983) Synopsis of biological data on the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). In: FAO Fish.Synop, 135:86

Small B C (2003) Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 218 177–185. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00302-2

Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ (2003) Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. Proc. R. Soc. Lond. 270:1115–1121. doi: 10.1098/rspb.2003.2349

Souza RAR, Carvalho CVA; Nunes FF, Scopel BR, Guarizi JD, Tsuzuki MY (2012) Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 38(3): 247 – 255.

Statgraphics® Centurion XVI, versão 16.1.11 (32-bit) 1982 – 2010 StatPoint Technologies, Inc.

Tarkhani R, Imani A, Jamali H, Farsani HG (1823) Anaesthetic efficacy of eugenol on various size classes of angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). Aquac Res 00:1–8. DOI:10.1111/are.13339

Tranquilli WJ, Thurmon JC, Gimm KA (2014) Anestesiologia e analgesia veterinária. 4 edn. Roca ISBN 9788541200080

Velisek J, Svobodova Z, Piackova V, Groch L, Nepejchalova L, (2005). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet. Med. – Czech, 50, (6): 269–275.

Viegas EMM, Pimenta FA, Gonçalves LU, Durães JP, Ribeiro MAR, (2012). Slaughter methods and fish meat quality. Arch Zootec 61:41–50. ISSN 1885-4494

West G, Heard D, Caulkett N (2007) Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Blackwell Publishing, Iowa. ISBN 978-0-8138-2566-3

Yamanaka H, Sogabe A, Handoh IC, Kawabata Z, (2011). The effectiveness of clove oil as an anesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio L.* Journal of animal veterinary advances 10 (2): 201-213. DOI: 10.3923/javaa.2011.210.213

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidencia a importância acerca de pesquisas sobre os métodos utilizados para anestesia ou eutanásia em peixes. O gelo, método amplamente utilizado no abate, não demonstrou eficácia na insensibilização, tendo em vista o longo período que os animais levaram para alcançar os estágios anestésicos desejados. A benzocaína se revelou como agente estressor, embora seja muito utilizada com o intuito contrário, principalmente em pesquisas. O eugenol, no entanto, pode vir a ser um substituto viável da benzocaína, embora novos estudos sejam necessários para se encontrar a dose anestésica ideal. Já como agentes eutanásicos ambos, eugenol e benzocaína em altas concentrações podem ser utilizados em condições de abate humanitário e em pesquisas, devido à sua rápida ação, insensibilizando o animal em poucos segundos, garantindo desta forma o bem-estar.