

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Curso de Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado**



Trabalho de Conclusão de Curso

**Eficácia dos anestésicos Eugenol, Benzocaína e MS222 no peixe-palhaço**  
***Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830**

**Natasha Carvalho**

Pelotas, 2014

**Natasha Carvalho**

**Eficácia dos anestésicos Eugenol, Benzocaína e MS222 no peixe-palhaço  
*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Rafael Soriani Medeiros

Co-orientador: Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A297e Aires, Natasha Carvalho

Eficácia dos anestésicos eugenol, benzocaína e ms222 no peixe-palhaço *amphiprion ocellaris cuvier*, 1830 / Natasha Carvalho Aires ; Rafael Soriani Medeiros, orientadora ; Ricardo Berteaux Robaldo, coorientador. — Pelotas, 2014.

33 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Anestesia. 2. Aquicultura. 3. Manejo. I. Medeiros, Rafael Soriani, orient. II. Robaldo, Ricardo Berteaux, coorient. III. Título.

CDD : 639.8

Natasha Carvalho

Eficácia dos anestésicos Eugenol, Benzocaína e MS222 no peixe-palhaço  
*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14 de novembro de 2014.

Banca examinadora:

.....  
Prof. MSc. Rafael Soriani Medeiros (Orientador). Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande.

.....  
Prof. MSc. Janaína Santos Pedron. Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande.

.....  
Prof. MSc. Fabiano Corrêa. Mestre em Oceanografia Biológica pela Universidade Federal do Rio Grande.

Dedico este trabalho a minha própria  
pessoa, pelo esforço e dedicação.

## **Agradecimentos**

À toda minha família, que desde sempre me ensinou a importância do conhecimento. Com destaque ao avô, mãe, padrasto e tio, que além de terem prestado total apoio no meu período de graduação, aturaram momentos de mau humor e de ausência, tanto física quanto mental.

Aos queridos orientadores Rafael Soriani Medeiros e Ricardo Berteaux Robaldo, pela paciência, dedicação, madrugadas de revisão de TCC e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Ao namorado Fabricio Kaefer, que da sua maneira me apoiou durante essa caminhada e muitas vezes me mostrou que as coisas não são tão difíceis quanto parecem, me dando ânimo para seguir em frente.

Aos Kaefer, por me acolherem tão carinhosamente, fazendo eu me sentir membro dessa grande e divertida família.

Aos afilhados Alexandra, Mário e Joana, que por serem crianças me obrigam a ser um exemplo, me dando mais certeza ainda que estou no caminho certo.

À querida Alinca Fonseca, pelo conhecimento que me transmitiu com seus tão simpáticos peixes anuais.

À Universidade Federal do Rio Grande, por me conceder espaço permitindo a realização deste trabalho.

E por último, e não menos importante, agradeço aos demais membros da minha família, os caninos, felinos e lagomorfos, por me proporcionarem muitos momentos de diversão e descontração.

*“Quem acredita sempre alcança”.*

(Mais uma vez- Renato Russo)

## Resumo

CARVALHO, Natasha. **Eficácia dos anestésicos Eugenol, Benzocaína e MS222 no peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830**. 2014. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Na aquicultura o uso de agentes anestésicos é de grande importância, pois estes podem evitar ou amenizar o estresse causado nos animais pelo manejo. Para tanto é necessário saber as concentrações corretas para que não haja danos nos animais e até mesmo mortalidade, levando a um mau desempenho no cultivo. Os objetivos do trabalho foram determinar as concentrações ideais dos anestésicos eugenol, benzocaína e MS222 para o peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* variedade black, e também indicar o anestésico com menor custo. Os testes foram realizados no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande. Para determinar as concentrações ideais foram utilizados 90 peixes-palhaço ( $0,33 \pm 0,14g$  e  $2,66 \pm 0,39cm$ ) criados no próprio laboratório. Os peixes foram expostos individualmente a 20, 30, 40, 50 e 60ppm de eugenol; 50, 70, 90, 110 e 130ppm de benzocaína e 80, 100, 120, 140 e 160ppm de MS222, sendo  $n=6$  por concentração. Para análises estatísticas foi usado ANOVA seguida por teste de Tukey e Kruskal-Wallis quando os dados não eram paramétricos. As equações que estimam a concentração para um tempo desejado foram traçadas com regressões lineares. As concentrações ideais obtidas, foram 50ppm para eugenol, anestesiando em  $89 \pm 20s$  e recuperando em  $197 \pm 21s$ ; 70ppm para benzocaína, anestesiando em  $90 \pm 20s$  e recuperando em  $174 \pm 114s$  e a menor concentração ideal para MS222 foi 120ppm, anestesiando em  $173 \pm 31s$  e recuperando em  $146 \pm 39s$ . Não houve mortalidade durante o experimento e nem após 24h. O anestésico com menor custo foi a benzocaína. Todos anestésicos foram eficazes, sendo o eugenol o mais eficaz por anestésiar com menor concentração. Considerando o custo-benefício, a benzocaína mostrou-se o melhor anestésico.

**Palavras-chave:** anestesia; aquicultura; manejo.



## Abstract

CARVALHO, Natasha. **Efficacy of anaesthetics eugenol, benzocaine and MS222 for clownfish *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830**. 2014. 33f. Course Conclusion Work (Bachelor's degree in biological sciences), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Anaesthetics agents are commonly used in aquaculture to reduce stress caused by handling fish. However, to do a correct anaesthesia is necessary to know the ideal concentrations of each agent to the target fish. These work aims to evaluate the ideal concentrations of eugenol, benzocaine and MS222 in *Amphiprion ocellaris*, and also determine the cost of each anaesthetic dose. The trials were made at Estação Marinha de Aquicultura of Universidade Federal do Rio Grande, Brazil. To the anaesthetic trials a total of 90 clownfish ( $0,33 \pm 0,14$ g and  $2,66 \pm 0,39$ cm) were exposed to five concentrations of each anaesthetic agent, 20-60ppm of eugenol, 50-130ppm of benzocaine and 80-160ppm of MS222. For statistical analysis, were made ANOVA and Tukey for parametric data and Kruskal-Wallis for non-parametric data, and for correlate anaesthetic dose and time of induction were made linear regressions. The ideal concentrations were 50, 70 and 120ppm for eugenol, benzocaine and MS222, respectively. The induction and recovery times at these doses were  $89 \pm 20$ s and  $146 \pm 39$ s for MS222. The most effective anaesthetic was eugenol but the less expensive was benzocaine.

**Key-words:** anaesthesia; aquaculture; handling.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Tempo total do ciclo de anestesia e recuperação sob diferentes concentrações do anestésico eugenol (média  $\pm$  erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos máximos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s) ..... 21
- Figura 2 Tempo total para o ciclo de anestesia e recuperação sob diferentes concentrações do anestésico benzocaína (médias  $\pm$  erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos máximos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s) ..... 22
- Figura 3 Tempo total para o ciclo de anestesia e recuperação sob diferentes concentrações do anestésico MS222 (médias  $\pm$  erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos máximos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s) ..... 23

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Características comportamentais de <i>Amphiprion ocellaris</i> durante as fases do ciclo de anestesia e recuperação .....	17
Tabela 2	Tempos registrados nos estágios do ciclo de anestesia e recuperação do peixe-palhaço <i>Amphiprion ocellaris</i> (média $\pm$ desvio padrão). As letras indicam diferenças significativas dos tempos médios entre as diferentes concentrações (ANOVA; Tukey; $p < 0,05$ ; $n=6$ ) .....	20
Tabela 3	Custo para o preparo de 1L de meio para anestesia do peixe-palhaço <i>A. ocellaris</i> sob concentrações indicadas para a espécie .....	23
Tabela 4	Equações para estimar a concentração a um determinado tempo para anestesia e recuperação dos anestésicos eugenol, benzocaína e MS222, com valores de $r^2$ e $r$ . “*” indicam $P < 0,05$ .....	24

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de Literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Local de Estudo.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Peixes utilizados.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Testes de Anestésicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>28</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>29</b>

## 1 Introdução

O peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 (Pomacentridae) é nativo dos oceanos Índico e Pacífico e muito apreciado no mercado da aquarioria marinha. Esta espécie é produzida comercialmente desde a década de 50 (WITTENRICH, 2007), e entre 1997 e 2002 foi a espécie ornamental marinha mais exportada no mundo (WABNITZ et al, 2003). Dados mais atuais mostram que entre 2004 e 2005 esta espécie foi a quinta mais importada pelos Estados Unidos, mesmo havendo diversas empresas produtoras deste peixe no país (RHYNE et al, 2012). A elevada demanda, somada às restrições de pesca em alguns recifes de corais, contribui para a importância desta espécie na aquicultura ornamental marinha.

Na aquicultura, boas técnicas de manejo são essenciais para o sucesso da produção. Sabe-se que peixes são sensíveis a estímulos dolorosos e medo, condições estressantes que devem ser evitadas ou minimizadas durante a manutenção no cativeiro (ROSS; ROSS, 2008). Mesmo atividades rotineiras como triagem, biometria, marcação, transporte, extrusão de gametas, vacinação e coleta de sangue podem causar danos físicos e estresse nos peixes (COYLE; DURBOROW; TIDWELL, 2004; WEBER et al, 2009). Estresse crônico pode afetar negativamente a homeostasia dos peixes, com reconhecido prejuízo na resposta imunológica e ingestão alimentar, favorecendo o surgimento de doenças e reduzindo o crescimento, o que conseqüentemente reduz o desempenho na produção. Neste contexto, o uso de anestésicos pode amenizar o estresse causados pelo manejo (ROSS; ROSS, 2008) favorecendo os lucros.

Segundo Marking; Meyer (1985), o anestésico ideal deve levar o peixe à anestesia profunda em três minutos ou menos, e recuperação em até cinco minutos, além de não ter efeito residual nos tecidos. A escolha do anestésico também deve levar em consideração fatores como segurança para os animais e manipuladores, segurança para o meio ambiente, além de boa disponibilidade comercial e custos razoáveis. Atualmente na aquicultura o eugenol, a benzocaína e a tricaina metanosulfato (MS222) estão entre os anestésicos mais utilizados (ROSS; ROSS, 2008).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o princípio ativo do óleo de cravo, obtido através da destilação do caule, flores e folhas das plantas *Eugenia aromaticum* e *Eugenia caryophyllata*, apresentando forte aroma e cor escura (ROSS; ROSS, 2008). É um anestésico local que, quando aplicado por banho de imersão em peixes, é absorvido pelas brânquias (ROSS; ROSS, 2008) e atua causando depressão do sistema nervoso central e conseqüentemente anestesia (GUÉNETTE et al, 2007). Segundo Iversen et al (2003), o eugenol apresenta boa disponibilidade no mercado e custo reduzido, além de ser seguro para os animais e manipulador.

No Brasil, a benzocaína é o agente anestésico mais utilizado na aquicultura, devido a seu baixo custo, boa disponibilidade, facilidade no manuseio e segurança (GOMES et al, 2001; INOUE; NETO; MORAES, 2002). A molécula de base da benzocaína é 4-aminobenzoato de etila, apresentando-se como um pó branco que deve ser mantido no escuro para que não perca suas propriedades. Este anestésico é insolúvel em água, devendo ser diluído em álcool ou cetonas para seu uso (ROSS; ROSS, 2008).

O MS222 (3-aminobenzoato de etila), assim como a benzocaína, é classificada como um anestésico local, mas difere desta principalmente por ser altamente solúvel em água e ter custo elevado. Apresenta-se como um pó branco e cristalino, de propriedades ácidas, causando deste modo acidificação do meio no qual é adicionado, mas possui boa margem de segurança para peixes e humanos (ROSS; ROSS, 2008).

Ambos benzocaína e MS222 apresentam o mesmo mecanismo de ação quando administrados em peixes através de banhos de imersão, entram na circulação e bloqueiam os canais de sódio voltagem-dependentes, inibindo o potencial de ação das células nervosas e levando à paralisia, além de bloquear a nocicepção (capacidade de sentir dor) (Z AHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Segundo Inoue; Neto; Moraes (2002) é de grande importância determinar os intervalos de tempo para anestesia para que haja um correto planejamento no manejo de peixes, porém sabe-se que as concentrações ideais de anestésicos são bastantes variáveis para as diferentes espécies de peixes (BITTENCOURT et al, 2012), portanto dominar as técnicas relativas ao manejo de *A. ocellaris*, como o conhecimento do anestésico ideal e sua concentração correta, torna-se

imprescindível para reduzir o estresse dos animais e suas possíveis consequências, alcançando o sucesso em seu cultivo.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Comparar a eficácia da eugenol, benzocaína, e MS222 como anestésico no peixe-palhaço *A. ocellaris* variedade black em cativeiro.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração ideal e o custo para anestesia do *A. ocellaris* com eugenol.

- Determinar a concentração ideal e o custo para anestesia do *A. ocellaris* com benzocaína.

- Determinar a concentração ideal e o custo para anestesia do *A. ocellaris* com MS222.

- Determinar regressões lineares entre as doses e os tempos de anestesia e recuperação para cada anestésico.

- Determinar entre os anestésicos testados qual apresentou melhor eficiência para utilização no peixe-palhaço *A. ocellaris*.

- Determinar qual anestésico testado apresentou melhor custo-benefício para anestesia no peixe-palhaço *A. ocellaris*.

## 2 Revisão de Literatura

É importante destacar que a eficácia de anestésicos, assim como a resposta a estes, é variável entre diferentes espécies de peixes e também pode sofrer influência tanto de fatores ambientais, como pH, salinidade e temperatura, quanto fatores biológicos como tamanho, peso, fase de vida, saúde, entre outros (BURKA et al, 1997; ROSS; ROSS, 2008; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Pedrazzani; Neto (2014) testaram a eficácia de quatro óleos, entre eles o de cravo, como anestésicos para o peixe-palhaço *A. ocellaris* e a partir dos resultados obtidos recomendam a concentração de 28ppm do óleo de cravo como ideal para anestésiar o peixe-palhaço. Cunha; Rosa (2006) testaram a eficácia do óleo de cravo em sete espécies de peixes tropicais, sendo cinco delas ornamentais e duas pertencentes à mesma família de *A. ocellaris* (*Abudefduf saxatilis* Linnaeus, 1758 e *Stegastes variabilis* Castelnau, 1855). Os autores sugerem a concentração de 20ppm de óleo de cravo, sendo esta eficaz nas sete espécies estudadas.

O eugenol também se mostrou um anestésico promissor para juvenis de salmão *Salmo salar* Linnaeus, 1758, anestesiando em baixas concentrações (30ppm) e reduzindo o estresse (IVERSEN et al, 2003); para juvenis de *Clarias gariepinus* Burchell, 1822, com concentração de 50ppm (OGRETMEN; GOKÇEK, 2013) e para o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1816, com a concentração de 65ppm (ROUBACH et al, 2005). Em juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* Cuvier, 1832, o eugenol mostrou ser um bom anestésico a 50ppm, porém tem custo elevado quando comparado com a benzocaína, que também se mostrou eficaz na mesma concentração (OKAMOTO et al, 2009).

Bittencourt et al (2012) concluem que os agentes anestésicos eugenol e benzocaína são eficazes para o quinguio *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 nas concentrações de 50 e 87,5ppm, respectivamente. Para juvenis de piraputanga (*Brycon hilarii* Valenciennes, 1850), ambos anestésicos são ideais, nas concentrações de 100 a 150ppm para eugenol e 100ppm para benzocaína (FABIANI et al, 2013).



A benzocaína para o matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869) quando comparada a 2-fenoxietanol é mais eficiente mesmo em concentrações baixas (INOUE; HACKBARTH; MORAES, 2004). Em *Carassius carassius* Linnaeus, 1758 a concentração de 100ppm foi eficiente (HEO; SHIN, 2010).

Wagner; Singer; McKinley (2003) compararam as respostas fisiológicas causadas em *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 pela exposição aos anestésicos MS222 e óleo de cravo, ambos com concentração de 60ppm, e notaram que as respostas foram semelhantes, mas os autores recomendam o uso do óleo de cravo, uma vez que esse oferece custo reduzido em relação ao MS222.

Park et al (2009) ao testarem as concentrações ideais de óleo de cravo em diferentes temperaturas para *Oplegnathus fasciatus* Temminck & Schlegel, 1844 relataram doses ideais de 150ppm em 20°C, 100 a 125ppm em 24°C e 50 a 75ppm em 28°C. Em estudo semelhante expondo o peixe ornamental *Peocilia latipinna* Lesueur, 1821 ao anestésico MS222 (150, 200 e 250ppm) em três diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C) o autor concluiu que em todas as temperaturas a concentração de 150ppm é segura, estando dentro dos tempos ideais para anestesia e recuperação (KUÇUK, 2010).

Pawar et al (2011) testaram a eficácia de quatro anestésicos, óleo de cravo, benzocaína, MS222 e PE (2-fenoxietanol) no cavalo marinho *Hippocampus kuda* Bleeker, 1852, um peixe ornamental. As concentrações ideais obtidas para óleo de cravo, benzocaína e MS222 foram 50; 175 e 125ppm, respectivamente. Estes autores, baseados nos tempos de indução e recuperação, concluíram que os anestésicos mais eficazes foram MS222 e óleo de cravo. Já para outra espécie de cavalo-marinho, *Hippocampus hippocampus* Linnaeus, 1758, 25ppm de eugenol é eficiente para realização de biometria, não havendo efeitos colaterais (Ferrer et al, 2010).

A partir de regressões lineares é possível obter equações que permitem calcular a concentração de um anestésico de acordo com o tempo de anestesia e tal método já foi empregado para algumas espécies como, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) para os anestésicos MS222 e propofol (GRESSLER et al, 2012) e *B. cephalus* para eugenol (INOUE; NETO; MORAES, 2003) e benzocaína (INOUE; NETO MORAES, 2002), permitindo portanto modular o tempo de anestesia conforme o procedimento desejado.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Local de estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM) da Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada no município de Rio Grande.

#### **3.2 Peixes utilizados**

Foram utilizados 90 peixes-palhaço ( $0,33\pm 0,14\text{g}$  e  $2,66\pm 0,39\text{cm}$ ) criados no LAPEM. Estes estavam aclimatados em aquário contendo 37L de água em sistema de recirculação, temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e salinidade  $23\text{‰}$ .

#### **3.3 Testes de Anestésicos**

Para os testes de anestesia, foram utilizadas cinco concentrações de cada anestésico, 20; 30; 40; 50 e 60ppm de eugenol (Biodinâmica, Brasil); 50; 70; 90; 110 e 130ppm de benzocaína (DELAWARE, Brasil); e 80; 100; 120; 140 e 160ppm de MS222 (Western chemical inc., Estados Unidos). As concentrações de eugenol e benzocaína foram obtidas através de soluções com os anestésicos diluídos dez vezes em álcool etílico. O MS222 foi pesado e adicionado diretamente na água, não havendo necessidade de preparo de solução estoque. Todos os testes foram realizados em dois aquários de 10L, um para anestesia e um para recuperação, com água do mar previamente filtrada ( $5\mu\text{m}$ , FilterLab, Brasil). A salinidade foi verificada medida com refratômetro digital (modelo PAL-06S, Atago, Japão) em  $23\text{‰}$  e a temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos, nos aquários usados para anestesia e recuperação, por oxímetro (modelo 550A, YSI, EUA) em  $23,8\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e

7,49±0,21mg/L. O pH também foi medido (8,07±0,29) com uso de pHmetro (modelo FiveEasy FE20, Mettler Toledo, Suíça). No teste com MS222, a alcalinidade foi medida, ficando em 193±57,51mg/L. Após o teste de cada concentração, os aquários foram lavados com álcool e água de torneira preparados para a próxima concentração.

Para cada concentração foram utilizados seis peixes. Cada peixe foi retirado, com auxílio de puçá, individualmente e de forma aleatória do aquário em que estavam aclimatados e transferidos para o aquário com anestésico. Após atingirem o último estágio de anestesia os peixes eram passados para o aquário de recuperação. Neste processo foram acompanhados, com auxílio de cronômetro digital, os tempos para atingir cada estágio de anestesia e de recuperação descritos na tabela 1. Após o teste com cada peixe, estes foram transferidos para tanques de 15L, separados conforme a concentração testada, alimentados *ad libitum* diariamente com ração comercial (Orange, Inve Aquaculture, EUA) e observados durante 24h para verificar possíveis mortalidades. Ao término do tempo de observação de todos os animais utilizados nos testes, foi realizada a biometria de 15 peixes usados em cada anestésico para avaliação do comprimento total e peso. Para anestesiá-los durante a biometria foi utilizada a concentração de 70ppm de benzocaína.

Tabela 1- Características comportamentais de *Amphiprion ocellaris* durante as fases do ciclo de anestesia e recuperação.

<b>Estágios de anestesia</b>	<b>Característica comportamental</b>
A1	Perda de equilíbrio
A2	Perda da natação, parada total da nadadeira caudal
A3	Batimento opercular irregular
<b>Estágios de recuperação</b>	
R1	Batimento opercular regular
R2	Volta do movimento de natação da nadadeira caudal
R3	Volta do equilíbrio

Fonte: Adaptado de Iwama; McGeer; Pawluk (1989)

### 3.4 Análise Estatística

Para análises estatísticas, a homogeneidade e normalidade dos dados foram testadas por testes de Levene e de Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Quando os dados não apresentaram homocedasticidade da variância ou distribuição normal, foram realizadas transformações logarítmicas e novamente testados quanto a estas premissas. Após, a comparação de médias foi realizada por análises de variância (ANOVA) de uma via seguidas por teste de Tukey. Nos casos em que mesmo com a transformação logarítmica os dados não cumpriram as premissas paramétricas, foram aplicados testes de ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis).

Para obter as equações que permitem estimar a concentração para um desejado tempo para anestesia e recuperação foram traçadas regressões lineares entre as concentrações dos diferentes anestésicos e seus respectivos tempos para anestesia e recuperação.

#### **4 Resultados**

Em todos os anestésicos utilizados foram encontradas diferenças significativas nos tempos de indução e recuperação entre as diferentes concentrações testadas. O eugenol foi o anestésico que necessitou de menor concentração para induzir a anestesia do *A. ocellaris*. A concentração de 80ppm de MS222 não foi suficiente para induzir os estágios de anestesia dentro do tempo de 15 minutos (Tabela 2).

Tabela 2- Tempos registrados nos estágios do ciclo de anestesia e recuperação do peixe-palhaço *Amphiprion ocellaris* (média  $\pm$  desvio padrão). As letras indicam diferenças significativas dos tempos médios entre as diferentes concentrações (ANOVA; Tukey;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

Estágios	Eugenol (ppm)				
	20	30	40	50	60
A1	28 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	19 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	20 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	17 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
A2	233 $\pm$ 97 <sup>ab</sup>	162 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	128 $\pm$ 43 <sup>ab</sup>	82 $\pm$ 19 <sup>ab</sup>	71 $\pm$ 16 <sup>b</sup>
A3	295 $\pm$ 156 <sup>a</sup>	164 $\pm$ 16 <sup>ab</sup>	136 $\pm$ 42 <sup>b</sup>	89 $\pm$ 20 <sup>bc</sup>	77 $\pm$ 15 <sup>c</sup>
R1	8 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	8 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	13 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	16 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	87 $\pm$ 177 <sup>ab</sup>
R2	61 $\pm$ 50	68 $\pm$ 14	81 $\pm$ 28	76 $\pm$ 24	146 $\pm$ 175
R3	404 $\pm$ 86	416 $\pm$ 225	345 $\pm$ 126	197 $\pm$ 21	348 $\pm$ 314
	Benzocaína (ppm)				
	50	70	90	110	130
A1	42 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	19 $\pm$ 6 <sup>bc</sup>	14 $\pm$ 3 <sup>bc</sup>	12 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
A2	236 $\pm$ 100 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	83 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	49 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	45 $\pm$ 12 <sup>c</sup>
A3	243 $\pm$ 205 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 20 <sup>ab</sup>	72 $\pm$ 19 <sup>abc</sup>	47 $\pm$ 10 <sup>bc</sup>	36 $\pm$ 9 <sup>c</sup>
R1	10 $\pm$ 7	10 $\pm$ 9	27 $\pm$ 48	27 $\pm$ 43	11 $\pm$ 5
R2	20 $\pm$ 11	36 $\pm$ 39	39 $\pm$ 53	52 $\pm$ 67	24 $\pm$ 5
R3	140 $\pm$ 53	249 $\pm$ 164	174 $\pm$ 114	225 $\pm$ 199	203 $\pm$ 99
	MS222 (ppm)				
	80	100	120	140	160
A1	63 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 8 <sup>ab</sup>	16 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	17 $\pm$ 4 <sup>bc</sup>
A2	*	275 $\pm$ 60 <sup>a</sup>	173 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	78 $\pm$ 17 <sup>c</sup>	67 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
A3	*	167 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	56 $\pm$ 15 <sup>c</sup>	38 $\pm$ 6 <sup>d</sup>
R1	*	11 $\pm$ 12	9 $\pm$ 4	9 $\pm$ 6	8 $\pm$ 2
R2	*	17 $\pm$ 13	24 $\pm$ 7	16 $\pm$ 9	15 $\pm$ 3
R3	*	186 $\pm$ 75 <sup>a</sup>	146 $\pm$ 39 <sup>a</sup>	173 $\pm$ 99 <sup>a</sup>	358 $\pm$ 131 <sup>b</sup>

Nos testes com eugenol os tempos de indução anestésica diminuiram conforme o aumento das concentrações (Figura 1), sendo a concentração 20ppm a mais lenta (295 $\pm$ 156s) e 60ppm a mais rápida (77 $\pm$ 15s). Com exceção da concentração de 20ppm, todas as demais induziram os três estágios de anestesia dentro do tempo de 180s. Os tempos de recuperação não apresentaram uma relação direta com as concentrações testadas e somente na concentração de 50ppm os peixes estavam completamente recuperados em menos que 300s.

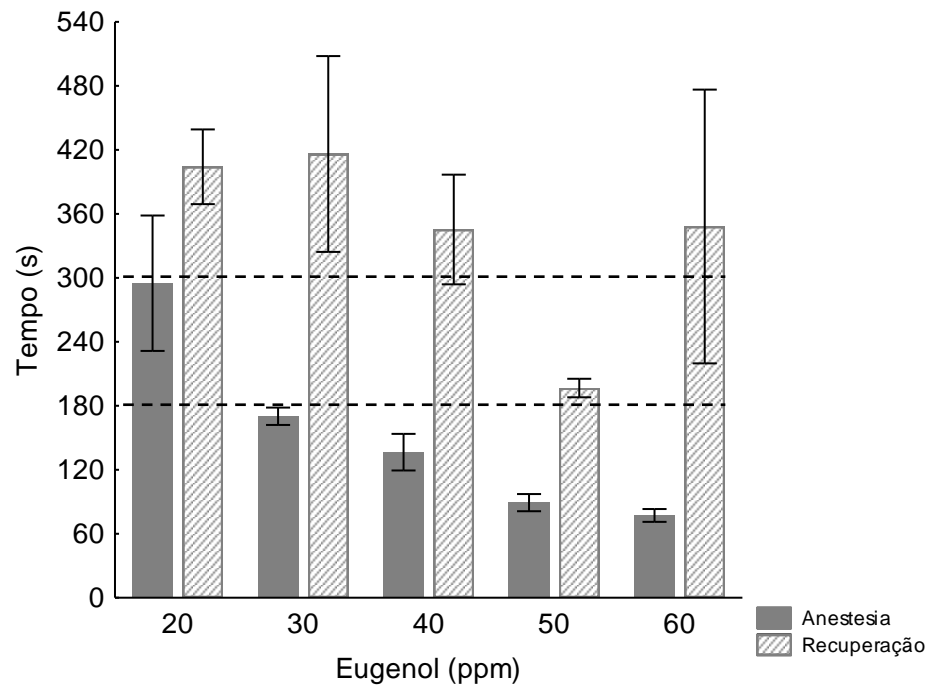


Figura 1- Tempo total do ciclo de anestesia e recuperação sob diferentes concentrações do anestésico eugenol (média  $\pm$  erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s).

Utilizando a benzocaína como anestésico, notou-se uma inversão entre as fases anestésicas A2 e A3 nas três concentrações mais altas (90, 110 e 130ppm) e os tempos totais para indução anestésica diminuíram com o aumento das concentrações. Com exceção da concentração de 50ppm, todas as outras concentrações induziram os três estágios de anestesia em menos que 180s (Figura 2). Na recuperação não houve uma relação direta entre os tempos e as concentrações testadas sendo o maior tempo ( $249 \pm 164$ s) na concentração de 70ppm e o menor ( $140 \pm 53$ s) em 50ppm. Em todas as concentrações o tempo de recuperação foi menor que 300s, não apresentando diferença significativa entre eles. Considerando o tempo de anestesia e de recuperação, as concentrações de 70 a 130ppm de benzocaína foram consideradas adequadas para anestesia do peixe-palhaço.

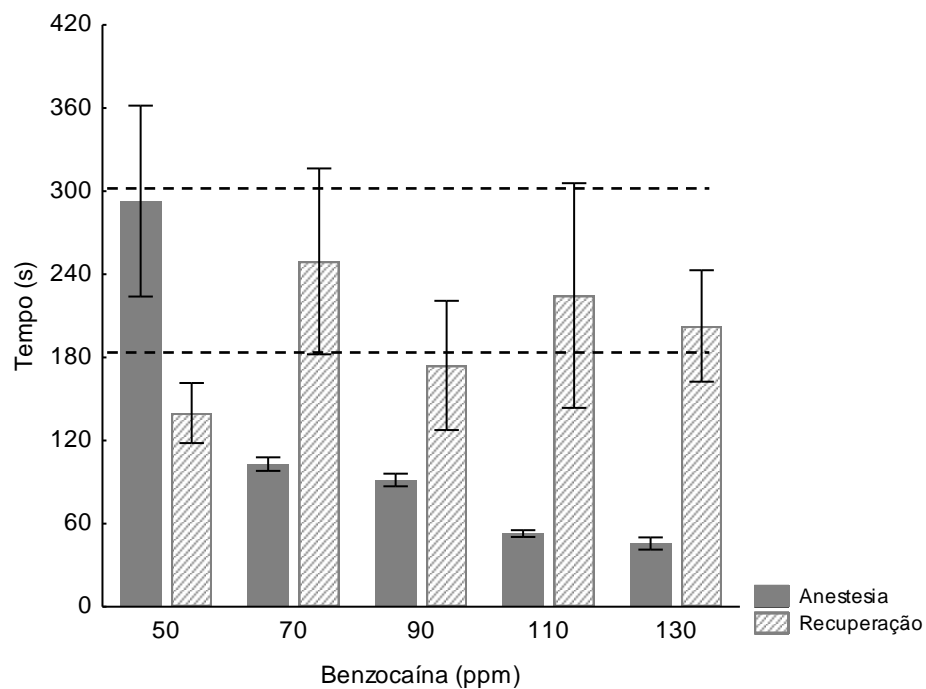


Figura 2- Tempo total para alcançar as três fases de anestesia e de recuperação nas diferentes concentrações testadas de benzocaína (média e erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s).

Nos testes com o MS222, em todas as concentrações efetivas, o estágio A2 ocorreu após o A3, havendo uma inversão, assim como ocorreu para benzocaína. As concentrações 120, 140 e 160ppm levaram aos três estágios de anestesia antes de 180s, e o tempo de anestesia diminuiu significativamente a medida que a concentração de MS222 aumentou. Com exceção da concentração de 160ppm, os peixes apresentaram recuperação em menos que 300s. Portanto, as concentrações de 120 e 140ppm são adequadas para a anestesia destes peixes.

A análise dos custos demonstrou que a benzocaína apresentou custo bastante reduzido em relação aos demais anestésicos utilizados. Os valores foram calculados usando as concentrações ideais para o uso em 1L. Os valores obtidos são apresentados na tabela 3.



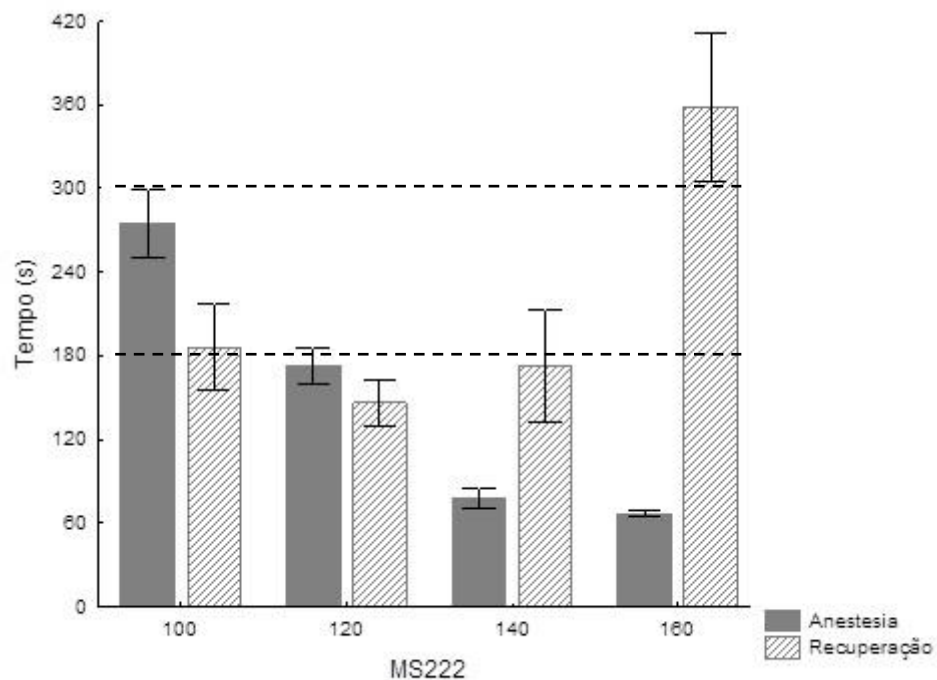


Figura 3- Tempo total para alcançar as três fases de anestesia e de recuperação nas diferentes concentrações testadas de MS222 (média e erro padrão). As linhas pontilhadas indicam os tempos ideais para anestesia (180s) e recuperação (300s).

Tabela 3- Custo para o preparo de 1L de meio para anestesia do peixe-palhaço *A. ocellaris* sob concentrações indicadas para a espécie.

Anestésico	Preço (R\$)	Peso ou Volume	R\$/mg	Dose	Custo em 1L (R\$)
Eugenol <sup>1</sup>	8,00	20mL*	0,0004	50	0,02
Benzocaína <sup>2</sup>	15,00	100g	0,0001	70	0,01
MS222 <sup>3</sup>	302,50	100g	0,003	120	0,36

Fabricante: Biodinâmica<sup>1</sup>; Delaware<sup>2</sup>; Western chemical<sup>3</sup>.

\*Densidade= 1,06g/cm<sup>3</sup>

Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento e durante as 24 horas de observação após os testes. Durante o período de observação todos os peixes voltaram a se alimentar normalmente e nenhum peixe apresentou sinais de estresse como agitação ou opérculo ofegante.

As equações que permitem estimar a concentração adequada a um determinado tempo para anestesia e recuperação por cada droga estudada são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4- Equações para estimar a concentração a um determinado tempo para anestesia e recuperação dos anestésicos eugenol, benzocaína e MS222, com valores de  $r^2$  e  $r$ . “\*” indicam  $P < 0,05$ .

	Eugenol	Benzocaína	MS222
<b>Anestesia</b>	* $y = 360,2667 - 5,1667.x$ ( $r^2 = 0,5034$ ; $r = -0,7095$ )	* $y = 362,1917 - 2,7225.x$ ( $r^2 = 0,4556$ ; $r = -0,6750$ )	* $y = 617,2 - 3,6075.x$ ( $r^2 = 0,6396$ ; $r = -0,7997$ )
<b>Recuperação</b>	$y = 474,7 - 3,315.x$ ( $r^2 = 0,0629$ ; $r = -0,2507$ )	$y = 152,6833 + 0,505.x$ ( $r^2 = 0,0121$ ; $r = 0,1102$ )	* $y = -136,8167 + 2,7133.x$ ( $r^2 = 0,2609$ ; $r = 0,5108$ )

A análise dos valores de  $r^2$  demonstra que as equações para anestesia foram satisfatórias, diferentemente das equações para recuperação, que apresentaram valores baixos de  $r^2$ , demonstrando alta variabilidade dos dados.

## 5 Discussão

A concentração ideal de eugenol para anestésiar *A. ocellaris*, 50ppm, foi igual a relatada para *C. auratus* (2g e 25°C), assim como para juvenis de *C. gariepinus* (6,5g e 22°C) e de *T. marginatus* (51,4g e 19°C) e para o cavalo marinho *H. kuda* (28,5°C), (BITTENCOURT et al, 2012; OGRETMEN; GOKÇEK, 2013; OKAMOTO et al, 2009; PAWAR et al, 2011). Park et al (2009) recomendam concentração semelhante, entre 50 e 75ppm, para *O. fasciatus* (139,5g) quando em temperatura de 28°C. Concentrações efetivas superiores a 50ppm foram observadas por Roubach et al (2005) em *C. macropomum* (56,6g e 26°C), sendo esta 65ppm, e por Fabiani et al (2013) em juvenis de *B. hilarii* (50g e 25°C), com valor ideal entre 100 e 150ppm. Entretanto, para juvenis de *S. salar* (45g e 5,4°C), a concentração ideal de eugenol é 30ppm, inferior à do peixe-palhaço (IVERSEN et al, 2003). Os peixes *A. saxatilis* (28°C) e *S. variabilis* (26,7°C) apesar de pertencerem à mesma família de *A. ocellaris*, Pomacentridae, também apresentaram concentração ideal (20ppm) (CUNHA; ROSA, 2006) inferior à recomendada no presente trabalho, reforçando a necessidade de trabalhos com anestésicos para cada espécie alvo, como indicado por Ross; Ross (2008).

Pedrazzani; Neto (2014) ao avaliarem a concentração de 35ppm de óleo de cravo em *A. ocellaris* (0,4g e 25°C) só retiraram alguns peixes do anestésico após estes atingirem a parada total do batimento opercular e acabaram registrando mortalidades nesta concentração. Por isto, foi recomendado por estes autores, a concentração de 28ppm de óleo de cravo, mesmo com o tempo de indução (310,5s) e recuperação (396s) encontrados muito superiores aos tempos ideais. Neste presente estudo a concentração de 50ppm de eugenol, não ocasionou mortalidades e foi a única em que os tempos de indução (89±20s) e recuperação (197±21s) ficaram dentro do ideal.

As concentrações ideais do anestésico benzocaína de 87,5ppm para *C. auratus* (BITTENCOURT et al, 2012), de 100ppm para *C. carassius* (HEO; SHIN, 2010) e juvenis de *B. hilarii* (FABIANI et al, 2013) encontram-se dentro da faixa de 70 a 130ppm aqui recomendadas como ideais para *A. ocellaris*. Já para juvenis de

*T. marginatus* a concentração ideal é apenas 50ppm (OKAMOTO et al, 2009), enquanto que para o cavalo marinho *H. kuda* a concentração ideal de benzocaína para anestesia chega a 175ppm (PAWAR et al, 2011), sendo esta superior a máxima concentração aqui recomendada para *A. ocellaris* de 130ppm.

O MS222 foi utilizado como anestésico para realização de biometrias e coletas de sangue de *A. ocellaris* (25°C) por Iwata et al (2008) e para eutanásia destes peixes (26,4°C) por Ho; O'Shea; Pomeroy (2013), entretanto estes autores não relataram as concentrações utilizadas. Neste atual trabalho foram encontradas 120 e 140 ppm como concentrações ideais de MS222 para anestesia do peixe-palhaço. Estas concentrações assemelham-se a de 125ppm obtida por Pawar et al (2011) para *H. kuda* e a de 150ppm obtida por Kuçuk (2010) para *P. latipinna* (0,2g e 20-30°C). King et al (2005) afirmam que 70ppm para *Centropristis striata* Linnaeus, 1758 (760g e 19°C) é suficiente para procedimentos curtos como biometria, sendo bastante inferior à concentração menor obtida para *A. ocellaris* de 120ppm.

Marco et al (2011) relatam diferença significativa entre os tempos de recuperação de MS222 e óleo de cravo para o esturjão híbrido (3,4kg) (*Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836 X *Acipenser baerii* Brandt, 1869), sendo esta recuperação mais rápida quando utilizado o MS222, assim como observado para *A. ocellaris*. Em geral, entre os três anestésicos testados neste trabalho, o MS222 apresentou recuperação mais rápida enquanto o eugenol foi o que apresentou a recuperação mais lenta. Ao analisar os tempos de recuperação, ou seja, o tempo para manipulação do animal, pode-se dizer que provavelmente o MS222 é adequado para procedimentos rápidos, enquanto o eugenol pode ser recomendado para procedimentos mais demorados.

Quando considera-se o custo-benefício, a benzocaína e o eugenol tornam-se os agentes anestésicos mais apropriados pois além de apresentarem as concentrações ideais para o peixe-palhaço, tem boa disponibilidade no mercado e custo reduzido quando comparado ao MS222, semelhante ao observado por Okamoto et al (2009) que apontam a benzocaína com melhor custo-benefício para *T. marginatus*.

As equações que permitem calcular a dose de anestésico de acordo com um determinado tempo não foram satisfatórias para a recuperação pois não houve uma

relação dose-dependente entre as concentrações de cada anestésico e os tempos para recuperar, diferentemente da indução anestésica, que apresentou tal relação. O mesmo pode ser observado para *B. cephalus* com o uso de óleo de cravo (INOUE; NETO; MORAES, 2003), onde há uma relação dose-dependente para anestesia e não há para recuperação, e é provável que por este motivo os autores só tenham apresentado as equações relativas à anestesia.

No presente estudo os três anestésicos testados demonstraram eficácia para anestesia de *A. ocellaris*, além de não ter ocorrido mortalidade durante e após o experimento. Porém existem outros fatores que devem ser avaliados quando se emprega o uso de tais substâncias, entre eles os possíveis impactos fisiológicos causados pelo uso dos anestésicos, uma vez que já existe estudo relatando que o uso de alguns anestésicos, incluindo o óleo de cravo e MS222, podem alterar parâmetros bioquímicos sanguíneos e marcadores de estresse oxidativo em *O. mykiss* (VELISEK et al, 2011). Portanto estudos referentes aos efeitos fisiológicos do uso de anestésicos em *A. ocellaris* ainda devem ser realizados.

## **6 Conclusão**

Considerando os tempos de anestesia e recuperação, pode-se concluir que os três anestésicos foram eficazes para anestésiar juvenis de *A. ocellaris*. O anestésico mais eficaz foi o eugenol, induzindo a anestesia em concentração de 50ppm enquanto a benzocaína e o MS222 necessitaram de ao menos 70 e 120ppm respectivamente. Porém levando em conta o custo-benefício, o anestésico mais apropriado é a benzocaína, com seu baixo custo no mercado em relação aos outros dois anestésicos testados.

## Referências

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B. E.; BOSCOLO, W. R.; RORATO, R. R.; FEIDEN, A.; NEU, D. H. Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1597-1602, 2012.

BURKA, J. F.; HAMMELL, K. L.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARE, D. J. Drugs in salmonid aquaculture- A review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 333-349, 1997.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. Anesthetics in aquaculture. **Southern Regional Aquacultures Center**, n. 3900, 2004.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 5, p. 1504-1512, 2006.

FABIANI, B. M.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; DIEMER, O.; BITTENCOURT, F.; NEU, D. H. Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brycon hilarii*. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 113-117, 2013.

FERRER, F.O.; MOLINA, L.; SOCORRO, J.; HERRERA, R.; PALACIOS, H. F.; IZQUIERDO, M. S. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9, p. e8-e18, 2010.

GOMES, L. C.; GOMES, A. R. C.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; LIMA, C. A. R. M. A. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001

GRESSLER, L.T.; PARODI, T. V.; RIFFEL, A. P. K.; DACOSTA, S. T.; BALDISSEROTTO, B. Immersion anaesthesia with tricaine methanesulphonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of fish Biology**, v. 81, n. 4, p. 1436-1445, 2012.

GUÉNETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, n. 1, p. 262-265, 2007.

HEO, G. J.; SHIN, G. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 37, n. 2, p. 132-135, 2010.

HO, A. L. F. C.; O'SHEA, S. K.; POMEROY, H. F. Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin. **Aquaculture International**, v. 21, n. 2, p. 361-374, 2013.

HOFF, Frank H. **Conditioning, spawning and rearing of fish with emphasis on marine clownfish**. Aquaculture consultants Incorporated, 1996. 212p.

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

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Benzocaína como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga**, v. 15, n. 1, p. 23-30, 2002.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, n. 1, p. 549-566, 2003.

IWAMA, G. K.; McGEER, J. C.; PAWLUK, M. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 8, p. 2065-2073, 1989.

IWATA, E; NAGAI, Y; HYODOU, M; SASAKI, H. Social environment and sex differentiation in the false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. **Zoological Science**, v. 25, n. 2, p. 123-128, 2008.



KING, W.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. L. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 14, p. 1442-1449, 2005.

KUÇUK, S. Efficacy of tricaine on *Peocilia latipinna* at different temperatures and concentrations. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 755-759, 2010.

MARCO, P. D.; PETOCHI, T.; LONGOBARDI, A.; PRIORI, A.; FINOIA, M. G.; DONADELLI, V.; CORSALINI, I.; MARINO, G. Efficacy of tricaine methanesulphonate, clove oil and medetomidine-ketamine and their side effects on the physiology of sturgeon hybrid *Acipenser naccari* X *Acipenser baerii*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 2, p. 611-617, 2011.

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

OGRETMEN, F.; GOKÇEK, K. Comparative Efficacy of Three Anesthetic Agents on Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 13, p. 51-56, 2013.

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

PARK, M. O.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; PARK, I. S. Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 427-430, 2009.

PAWAR, H. B.; SANAYE, S. V.; SREEPADA, R. A.; HARISH, V.; SURYAVANSHI, U.; TANU; ANSARI, Z. A. Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). **Aquaculture**, v. 311, n. 1, p. 155-161, 2011.

PEDRAZZANI, A. S.; NETO, A. O. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, p. 1-8, 2014.

RHYNE, A. L.; TLUSTY, M. F.; SCHOFIELD, P. J.; KAUFMAN, L; MORRIS, J. A. JR.; BRUCKNER, A. W. Revealing the Appetite of the Marine Aquarium Fish Trade: The Volume and Biodiversity of Fish Imported into the United States. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35808, 2012.

ROSS, Lindsay G.; ROSS, Barbara. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. 3.ed. Blackwell Publishing, 2008. 222p.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

Sigma- Aldrich. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em: 9 out. 2014.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z-H.; SILOVSKA, S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 310, n. 3, p. 369-375, 2011.

WABNITZ, Colette; TAYLOR, Michelle; GREEN, Edmund; RAZAK, Tries. **From ocean to aquarium: The global trade in marine ornamental species**. Cambridge: UNEP-WCMC, 2003. 64p.

WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; MCKINLEY, R. S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 34, n. 13, p. 1139-1146, 2003.

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J. B.; MARTÍN, L. O. G.; ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v. 288, n. 1, p. 147-150, 2009.

WITTENRICH, Matthew. L. **The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes**. USA, Neptune city, NJ: Microcosm Ltd. and T.F.H. Publications Inc., 2007. 303p.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 201-218, 2012.