



CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AQUICULTURA

LUANA GABRIELI LAMBERTI

**EFEITO DA TEMPERATURA NA ANESTESIA COM MENTOL EM
GUPPY (*Poecilia reticulata*)**

URUGUAIANA

2019

LUANA GABRIELI LAMBERTI

**EFEITO DA TEMPERATURA NA ANESTESIA COM MENTOL EM
GUPPY (*Poecilia reticulata*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso Superior de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientadora: Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

URUGUAIANA

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

Lille Lamberti, Luana Gabrieli
EFEITO DA TEMPERATURA NA ANESTESIA COM MENTOL EM
GUPPY (Poecilia reticulata) / Luana Gabrieli
Lamberti.

43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)--
Universidade Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2019.
"Orientação: Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku
Neis".

1. Anestésicos naturais. 2. Peixe ornamental. 3.
Filhotes. 4. Peixes adultos. I. Título.

LUANA GABRIELI LAMBERTI

**EFEITO DA TEMPERATURA NA ANESTESIA COM MENTOL EM
GUPPY (*Poecilia reticulata*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso Superior de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientadora: Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 29 de novembro de 2019.

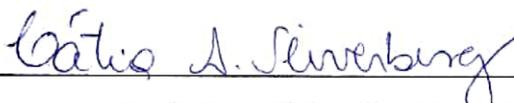
Banca examinadora:



Prof^ª. Dra. Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

Orientadora

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof^ª. Dra. Cátia Aline Veiverberg

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Márcio Aquio Hoshiba

Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Dedico este trabalho a todos aqueles que se fizeram presentes durante minha vida acadêmica e que de algum modo me ajudaram a seguir em frente.

AGRADECIMENTO

Inicialmente agradeço a todos os colegas e amigos que se fizeram presentes na minha caminhada durante a vida acadêmica e agradeço principalmente aqueles que me auxiliaram no decorrer dos experimentos. A Alessandra Perez Gomes meu muito obrigada por ser parte deste trabalho, também agradeço por seus conselhos e pelo apoio quando mais precisei.

Ao meu namorado, Jorge Renato, pela participação durante os experimentos e por sempre me apoiar e incentivar; você me mostrou o quanto é maravilhoso e reconfortante ter alguém para contar incondicionalmente, não importa a situação. Obrigada por existir e me fazer muito feliz todos os dias. Aos meus sogros, que me acolheram no seio familiar de braços e corações abertos, não sei o que seria de mim sem vocês nesta reta final. Obrigada por tudo sempre. Amo vocês profundamente!

À minha princesinha, Isabella, que há 7 anos me ensina o significado de amor incondicional. Mesmo que você não entenda ainda, eu me dedico diariamente à realização dos meus sonhos por ti, para que tu tenha um exemplo positivo a seguir quando se tornar adulta. A maninha tem orgulho da menina que tu estás te tornando, meu amor, e apesar de você ainda ser uma criança recém aprendendo a ler, sei que tens um belo caminho pela frente e eu estarei a todo momento do teu lado, para te proteger, te amar e apoiar. Será para sempre o meu bebê, que eu tanto desejei, minha bonequinha. Você é a luz da minha vida. Te amo eternamente!

Deixo aqui também um agradecimento a todos professores do Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura. Obrigada por sempre apoiarem e incentivarem a todos os alunos; vocês fazem a diferença na vida de todos o que passam por suas salas de aulas, são exemplos de pessoas e profissionais. Obrigada também por todo o conhecimento passado, por todas as conversas e experiências proporcionadas em todos estes anos de Aquicultura. Agradeço, especialmente, a Prof^ª. Cátia, que me auxiliou com a estatística deste trabalho e sempre esteve disposta a ajudar. Obrigada professora, és uma inspiração para mim.

Agradeço também as meninas do Laboratório de Aquariorfilia, Andressa, Brenda, Jéssica e Kimberly, por terem quebrado vários galhos para mim ao cuidarem e alimentarem dos peixes quando eu não podia, sem vocês eu teria enlouquecido na reta final do

experimento. Vocês são demais. Estendo meu agradecimento ao Prof. Dr. Giovani, responsável pelo laboratório, por sempre estar disposto a ajudar em relação aos peixes.

Quase no fim, meu agradecimento especial para a pessoa que me viu crescer na universidade, que esteve comigo desde o início. Prof^a. Alessandra, a senhora me inspira a sempre buscar o melhor de mim, já disse antes mas vou repetir, eu não poderia ter escolhido orientadora melhor, este trabalho não seria possível sem a senhora. Obrigada por ter me proporcionado a honra de fazer parte da sua vida como orientada, por sempre me incentivar rumo ao crescimento acadêmico, por ter acreditado no meu potencial, pela dedicação e perseverança e, principalmente, pela amizade. És meu exemplo de mulher forte. Por tudo isso, meu eterno agradecimento!

Agradeço, por fim, a Universidade Federal do Pampa e ao Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura por me permitir realizar um dos maiores sonhos da minha vida.

Eternamente grata a todos!

“Nada é tão nosso quanto nossos sonhos.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Os óleos essenciais de plantas para anestesia em peixes apresentam-se como alternativa ao uso de produtos químicos, que possuem alto custo e podem causar danos aos animais. Apesar de apresentarem inúmeras vantagens na redução do estresse, a eficácia dos anestésicos pode ser influenciada por fatores como o tamanho do animal, a idade, o sexo e a espécie, além de fatores ambientais como a temperatura da água. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de mentol para anestesia de Guppy (*Poecilia reticulata*) e a influência da temperatura da água durante o procedimento. Foram realizados dois experimentos: no primeiro, os animais foram divididos em fêmeas, machos e filhotes e submetidos, individualmente, às concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ de mentol, e no segundo, os animais foram anestesiados com a concentração de 100 mg L⁻¹ em 24, 27 e 30°C. Foram cronometrados os tempos de indução e recuperação verificados através de mudanças comportamentais, assim como foi avaliada a sobrevivência após o experimento. A análise de variância e a comparação das médias foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey (5%). Os resultados encontrados sinalizam que o mentol pode ser utilizado como anestésico para Guppy em concentrações mais elevadas, pois a dose de 50 mg L⁻¹ não foi suficiente para que os animais atingissem o estágio de anestesia profunda. Doses entre 100 e 200 mg L foram eficientes para anestesia nas três categorias, de maneira dose dependente. Em relação à temperatura, foi possível verificar influência direta sobre os tempos de indução e recuperação anestésica, na qual a temperatura de 30°C apresentou os menores tempos durante o procedimento anestésico, como esperado para um animal pecilotérmico. Também foi possível observar maior sensibilidade dos filhotes durante a anestesia, em comparação com os adultos. Por fim, considerando a menor dose necessária para indução anestésica, recomenda-se a concentração 150 mg L⁻¹ para fêmeas, machos e filhotes de Guppy.

Palavras-chaves: anestésicos naturais; peixe ornamental; filhotes; peixes adultos.

ABSTRACT

Plant essential oils for fish anesthesia are an alternative to the use of expensive chemicals, which could be expensive and cause damage to animals. However, although they have numerous advantages in reducing stress, anesthetic efficacy may be influenced by factors such as animal size, age, sex and species; in addition to environmental factors such as water temperature. Therefore, the objective of present study was to evaluate different menthol concentrations for Guppy (*Poecilia reticulata*) anesthesia and water temperature influence during the procedure. Two experiments were performed: first, animals were divided into females, males and juveniles and individually submitted to menthol concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹, and second, animals were anesthetized with menthol 100 mg L⁻¹ at 24, 27 and 30°C. The induction and recovery times, verified through physiological and behavioral changes, were timed, as well as survival after the experiment was evaluated. Analysis of variance and comparison of means were performed by two-way ANOVA, followed by Tukey's test (5%). Results indicate that menthol can be used as an anesthetic for Guppy in higher concentrations, because 50 mg L⁻¹ dose was not enough for animals to reach deep anesthesia stage. Doses between 100 and 200 mg L⁻¹ were efficient for anesthesia in the three categories, in a dose dependent manner. Regarding the temperature, it was possible to verify a direct influence on induction and recovery times, in which 30°C temperature presented the shortest times during anesthetic procedure, as expected for a poecilohermal animal. It was also possible to observe greater sensitivity of juveniles during anesthesia compared to adults. Finally, considering the lowest dose required for anesthetic induction, a concentration of 150 mg L⁻¹ is recommended for Guppy females, males and juveniles.

Keywords: natural anesthetics; ornamental fish; juveniles; adult fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casal de guppies.....	15
Figura 3: Planta de gênero <i>Mentha</i> spp.	18
Figura 4: Aquários de criação contendo 26,25 L em Sistema de Recirculação de Água.....	21
Figura 5: Exemplares de Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) utilizados no experimento. a) fêmea adulta; b) macho adulto e c) filhote.	22
Figura 6: Aquários pós-experimento. Aquário contendo 12 litros para monitoramento da sobrevivência.....	24
Figura 7: Biometria dos animais com auxílio de um paquímetro digital	25

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Peso médio (em mg) e comprimento total médio (CT, em mm) dos guppies machos, fêmeas e filhotes expostos a diferentes concentrações de mentol.	27
Tabela 2: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de machos de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.	28
Tabela 3: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de fêmeas de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.	29
Tabela 4: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de filhotes de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.	30
Tabela 5: Tempo (em minutos) de indução anestésica de filhotes, fêmeas e machos de Guppy expostos a diferentes temperaturas.	32
Tabela 6: Tempo (em minutos) de recuperação anestésica de filhotes, fêmeas e machos de Guppy expostos a diferentes temperaturas.	33
Quadro 1: Comparativo de diferentes anestésicos naturais para espécies de peixes comerciais.	17
Quadro 2: Estágios de indução e recuperação anestésica em peixes.	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ORIGEM DOS ANIMAIS.....	21
3.2	PREPARAÇÃO DO ANESTÉSICO MENTOL	22
3.3	EXPERIMENTO 1: ANESTESIA COM MENTOL EM GUPPY	22
3.3.1	Animais.....	22
3.3.2	Tratamentos	23
3.3.3	Biometria	25
3.4	EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A ANESTESIA.....	25
3.4.1	Animais.....	25
3.4.2	Tratamentos	26
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
	RESULTADOS	27
3.6	EXPERIMENTO 1: ANESTESIA COM MENTOL EM GUPPY	27
3.6.1	Análise dos resultados de anestesia nos machos	28
3.6.2	Análise dos resultados de anestesia das fêmeas	29
3.6.3	Análise dos resultados de anestesia dos filhotes	30
3.7	EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A ANESTESIA.....	31
3.7.1	Análise dos resultados de indução anestésica de filhotes, fêmeas e machos	31

3.7.2 Análise dos resultados de recuperação anestésica de filhotes, fêmeas e machos

33

4	DISCUSSÃO.....	34
4.1	Experimento 1: Anestesia com diferentes concentrações de mentol em Guppy	34
4.2	Experimento 2: Influência da temperatura durante a anestesia	36
5	CONCLUSÕES.....	38
6	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Aquicultura é definida como o cultivo de animais aquáticos e semiaquáticos de água doce, salobra ou marinha (CONTE, 2004). Dentro desta atividade está inserido o segmento de peixes ornamentais, que faz parte do Mercado Pet, parcela econômica que vem se expandindo em todo o mundo (FARIA et al., 2016a).

Em 2014, Singapura exportou cerca de US\$ 50,2 milhões em peixes ornamentais, ocupando o primeiro lugar no ranking de maiores produtores de ornamentais (FARIA et al., 2019). No mesmo ano, o Brasil ocupou a oitava colocação com US\$ 13,5 milhões (FARIA et al., 2016b), sendo o estado de Minas Gerais o maior polo produtor do país (CARDOSO et al., 2012).

Apesar do grande desenvolvimento do setor ornamental brasileiro, segundo Ribeiro et al. (2008) não existem estatísticas oficiais acerca da produção de peixes ornamentais pela aquicultura. Porém, os autores estimam que as principais espécies vendidas sejam Betta (*Betta splendens*), Kinguio (*Carassius auratus*), carpa colorida (*Cyprinus carpio*) e Guppy (*Poecilia reticulata*). O último levantamento oficial sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil foi realizado em 2011 pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), porém a aquicultura ornamental não foi considerada para a realização deste estudo.

Os guppies são bastante populares entre os aquaristas do mundo, devido à sua beleza, variedade de cores, fácil reprodução e manutenção (IGARASHI et al., 2004). A espécie é originária do norte da América do Sul e foi introduzida no Brasil no século XIX (ALVES et al., 2000).

Apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos menores, mais coloridos e com a nadadeira caudal maior em relação à da fêmea (Figura 1) (MARTINS, 2011). São capazes de tolerar altas densidades, grandes variações de temperatura, pH, dureza e salinidade da água; além de serem altamente prolíferos (IGARASHI et al., 2004), características que os tornam desejáveis para o cultivo.

Figura 1: Casal de guppies



Macho à esquerda, espécime menor, porém com a nadadeira caudal maior contrastando com a fêmea à direita. Fonte: Sítio Eletrônico Arca de Noé – VivaPets.

Apesar de o mercado de peixes ornamentais estar em constante desenvolvimento, um dos problemas recorrentes é o estresse causado pelas práticas usuais do dia a dia de uma propriedade (MENDES et al., 2015), como a despesca, o manuseio para biometrias, o transporte e, principalmente, os fatores ambientais, como quedas bruscas de temperatura da água, que alteram o sistema imunológico do animal (FALCON et al., 2008).

O estresse é definido como um conjunto de respostas do organismo a fatores ambientais ou não, que sejam considerados ameaçadores, podendo variar de intensidade conforme a gravidade e duração do estímulo, além do fator genético e nível de domesticação do animal (TAKAHASHI et al., 2006). Este conceito, segundo Silveira et al. (2009), representa uma situação onde o animal seja incapaz de manter sua homeostase, devido a fatores chamados estressantes. Os agentes estressores podem ser de naturezas físicas (transporte, confinamento, manejo e temperatura da água), natureza química (contaminantes, baixo nível de oxigênio dissolvido e pH reduzido ou elevado) ou de natureza social/comportamental (presença de predadores, por exemplo) (DINIZ; HONORATO, 2012). A exposição moderada a estes agentes produz uma resposta adaptativa nos peixes que restitui o equilíbrio ao organismo, no entanto, se o estímulo estressor continuar por período prolongado ou for muito intenso, esta resposta adaptativa pode não ocorrer, levando o animal à exaustão, acarretando danos para a sua sanidade (GALHARDO; OLIVEIRA, 2006).

As reações fisiológicas desencadeadas pelo estresse são estimuladas em sistema de cascata, provocando respostas em defesa do organismo (FAGUNDES, 2005), que são divididas em três categorias (primária, secundária e terciária), chamadas de “Síndrome de Adaptação Geral” (SAG).

A resposta primária, conhecida como reação de alarme, atua na ativação dos centros cerebrais, imediatamente após a percepção do agente estressor (SILVEIRA et al., 2009), resultando na liberação de catecolaminas e corticosteroides no plasma (LIMA et al., 2006).

Estes hormônios estimularão mudanças bioquímicas e fisiológicas, como o aumento dos batimentos cardíacos e da absorção de oxigênio, alterações na glicemia, no acúmulo de ácido láctico e do glicogênio hepático e muscular, entre outros efeitos, sendo caracterizada como resposta secundária (FAGUNDES, 2005), conhecida também como a fase de resistência.

Se o agente estressor for crônico o animal entra na fase de exaustão de capacidade adaptativa (resposta terciária), esta fase afeta o crescimento, a reprodução, a resposta imune e a resistência às doenças (GALHARDO; OLIVEIRA, 2006), podendo levar à morte do animal.

Dessa forma, é preciso que os produtores adotem práticas de manejos para minimizar a ocorrência de estresse nos animais, dentre os quais o monitoramento da qualidade da água, alimentação adequada, densidade de estocagem e sanidade (OLIVEIRA; GALHARDO, 2007) são fundamentais para proporcionar bem-estar aos peixes, para que estes expressem seu potencial zootécnico. Além destes, o uso de anestésicos têm facilitado o manejo geral e demonstra eficácia no controle do estresse dos peixes (ROTILI et al., 2012).

Durante o processo de indução anestésica, os peixes passam por vários estágios de anestesia: anestesia leve (movimento natatório reduzido, reação a estímulos externos e equilíbrio normal), anestesia moderada (perda do movimento muscular e do equilíbrio, redução do movimento opercular e dos reflexos a estímulos externos) e anestesia profunda (perda total dos reflexos a estímulos externos e movimento opercular quase ausente); assim como na recuperação: retorno dos movimentos operculares, recuperação do equilíbrio e recuperação total. Portanto, para que o procedimento seja bem sucedido é fundamental que o operador esteja atento aos diferentes estágios apresentados pelos animais (ROUBACH; GOMES, 2001).

Mundialmente existem inúmeros produtos químicos utilizados como anestésicos para peixes, sendo os mais comuns a tricafina metano sulfonato (MS-222), o sulfato de quinaldina, a benzocaína e o fenoxietanol (INOUE, SANTOS NETO, MORAES, 2003). No entanto, a eficiência destes produtos pode ser inconstante (TAVARES-DIAS et al., 2015) e, ainda, causar efeitos adversos aos peixes, como a perda de muco, irritação branquial e lesões nas córneas (INOUE et al., 2003). Podendo ocorrer também danos aos manipuladores e principalmente ao meio ambiente, além de serem de difícil obtenção e possuírem alto custo.

Desta forma, a busca por anestésicos alternativos de origem vegetal começou a incentivar pesquisas na área (GONÇALVES et al., 2008). Óleos essenciais (OE's) como eugenol (CUNHA et al., 2010; BITTENCOURT et al., 2012; SANTOS et al., 2017; DUARTE, HONORATO, SANTOS, 2015; HOSHIBA et al., 2015; CUNHA et al., 2015), *Lippia alba* (CUNHA et al., 2011; SILVA et al., 2019) e mentol (TEIXEIRA et al., 2011;

HOSHIBA et al., 2015; ROMANELI et al., 2018) são algumas das substâncias que vêm sendo testadas como possíveis anestésicos para peixes, obtendo bons resultados (Quadro 1).

Quadro 1: Comparativo de diferentes anestésicos naturais para espécies de peixes comerciais.

Anestésico	Dose testada	Espécie	Fase de desenvolvimento	Referência
Eugenol	10-50 mg L ⁻¹ (30 mg L ⁻¹) *	<i>Mollienesia</i> sp.	Juvenil	Santos et al. (2017)
Eugenol	12,5-75 mg L ⁻¹ (50 mg L ⁻¹) *	<i>Carassius auratus</i>	Juvenil	Bittencourt et al. (2012)
Eugenol	12-200 mg L ⁻¹ (25 e 50 mg L ⁻¹) *	<i>Betta splendens</i>	Juvenil	Duarte, Honorato, Santos (2015)
Eugenol	50-200 mg L ⁻¹ (100-200 mg L ⁻¹) *	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Juvenil	Hoshiba et al. (2015)
Eugenol	50-150 mg L ⁻¹ (150, 75, 125 mg L ⁻¹ , respectivamente)	<i>Poecilia reticulata</i>	Juvenil Fêmea, Macho (adultos)	Cunha et al. (2015)
Eugenol	5-70 mg L ⁻¹ (20-50 mg L ⁻¹)	<i>Rhamdia quelen</i>	Juvenil	Cunha et al., (2010)
Mentol	50-250 mg L ⁻¹ (100-250 mg L ⁻¹) *	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Juvenil	Hoshiba et al. (2015)
Mentol	50-250 mg L ⁻¹ (150 mg L ⁻¹) *	<i>Pterophyllum scalare</i>	**	Romaneli et al. (2018)
Mentol	30-300 mg L ⁻¹ (60, 180, 240 mg L ⁻¹ , respectivamente) *	<i>Oreochromis niloticus</i>	Alevino, juvenil e adulto	Teixeira et al. (2011)
<i>Lippia alba</i>	20-160 mg L ⁻¹ (160 mg L ⁻¹) *	<i>Colossoma macropomum</i>	Juvenil	Silva et al. (2019)
<i>Lippia alba</i>	8-360 mg L ⁻¹ (120 mg L ⁻¹) *	<i>Hippocampus reidi</i>	Juvenil	Cunha et al. (2011)

* Melhor dose recomendada pelo autor. ** Fase de desenvolvimento não estabelecida no artigo.

Atualmente, no Brasil, os principais anestésicos naturais utilizados comercialmente são: o óleo de cravo, que tem como princípio ativo o eugenol (INOUE et al., 2011); e o mentol. O mentol é o componente majoritário no óleo essencial da menta, *Mentha spp.* (Figura 3) também conhecida como hortelã.

Figura 2: Planta de gênero *Mentha* spp.



Fonte: Mundo Educação.

Além de comprovadamente possuir propriedades anestésicas, a menta é utilizada na produção de chicletes e balas (como aromatizante), e também possui largo emprego na indústria farmacêutica, pois suas folhas possuem vitaminas A, B, C e minerais, como cálcio, ferro e potássio (WATANABE et al., 2006).

O óleo essencial é produzido em estruturas chamadas de tricomas glandulares presentes principalmente nas folhas da planta (DESCHAMPS et al., 2006) e é extraído através de processos de destilação por arraste a vapor ou extração com solventes voláteis (WATANABE et al., 2006). O mentol é comercializado na forma de cristais, após o resfriamento do óleo bruto. Ao ser utilizado como anestésico para peixes, o mentol cristal deve ser diluído com etanol até formar uma substância homogênea, devendo ser armazenado em recipiente escuro (ROUBACH; GOMES, 2001).

Este anestésico, além de apresentar baixa toxicidade e ser facilmente encontrado no mercado nacional (GONÇALVES et al., 2008) já possui eficácia comprovada em diversas espécies de peixes comerciais, como dourado (PÁDUA et al., 2010), tilápia-do-nilo (SIMÕES, GOMES, 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

Apesar de serem muito utilizados e apresentarem vantagens na redução do estresse em peixes, a eficácia dos anestésicos está diretamente ligada a fatores intrínsecos ao animal, ou seja, peixes com tamanho, idade, sexo e espécies diferentes podem responder de forma

diversa a uma concentração (KING et al., 2005). Além disto, a resposta a anestesia também é influenciada por fatores ambientais, como pH, salinidade, temperatura e nível de oxigênio dissolvido na água (Z AHL et al., 2009).

A temperatura da água é um dos fatores mais importantes quando falamos em peixes, pois estes são animais ectotérmicos (PIRES, 2019), ou seja, regulam sua temperatura corporal de acordo com a temperatura do ambiente, influenciando no metabolismo dos animais (WATTS; MUNDAY; BURKE, 2002). Além disto, a temperatura influencia na taxa de consumo de oxigênio (Z AHL et al., 2009) na ingestão e aproveitamento de nutrientes (LOURES et al., 2001), bem como na reprodução e no crescimento dos animais; sendo também, um importante fator relacionado ao surgimento de doenças (REBOUÇAS et al., 2014).

Diante do exposto, observa-se que estudos envolvendo anestesia de peixes ornamentais ainda são muito incipientes (SANTOS et al., 2017; BITTENCOURT et al., 2012; HOSHIBA et al., 2015) e, no que diz respeito à influência da temperatura durante este procedimento, são escassos (MYLONAS et al., 2005; Z AHL et al., 2009; GOMES et al., 2001), justificando-se a necessidade de mais estudos sobre ambos os temas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do anestésico mentol em diferentes doses e temperatura de água para machos, fêmeas e filhotes de Guppy (*Poecilia reticulata*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a melhor concentração anestésica de mentol para Guppy machos e fêmeas adultos e filhotes, suficiente para uma segura indução e recuperação.

Avaliar a influência da temperatura da água nos tempos de indução e recuperação anestésica de machos e fêmeas adultos e filhotes de Guppy.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DOS ANIMAIS

Os animais utilizados em ambos os experimentos foram adquiridos comercialmente ou foram provenientes da reprodução de matrizes do Laboratório de Aquariorfilia, da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana.

Os espécimes adquiridos comercialmente foram aclimatados por um período de sete dias em aquários contendo 10 litros de água a uma densidade de estocagem de 10 peixes por aquário. Após o período de adaptação os animais foram transferidos para o sistema de recirculação com filtro biológico (Figura 4), juntamente com os peixes pertencentes ao plantel do laboratório, mantidos a uma temperatura de 26 a 28 °C, com fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro).

Figura 3: Aquários de criação contendo 26,25 L em Sistema de Recirculação de Água



Fonte: Arquivos pessoais

A alimentação foi oferecida diariamente com artêmia salina (*Artemia* sp.) no período da manhã (9:00 horas) e com ração comercial, enriquecida com Spirulina (PB 42%), específica para peixes ornamentais duas vezes no período da tarde (13:00 e 17:00 horas). Foram realizadas, diariamente, sifonagens para retirada de fezes, renovando-se 10% de água de cada aquário.

3.2 PREPARAÇÃO DO ANESTÉSICO MENTOL

A matéria prima (mentol cristal) foi adquirida comercialmente em farmácia de manipulação de Uruguaiana, RS.

As concentrações de mentol empregadas neste experimento foram escolhidas a partir de trabalhos realizados com espécies de peixes comerciais (CUNHA, 2014; HOSHIBA et al., 2015), visto que, estas dosagens estão entre as mais utilizadas em estudos com anestesia em peixes.

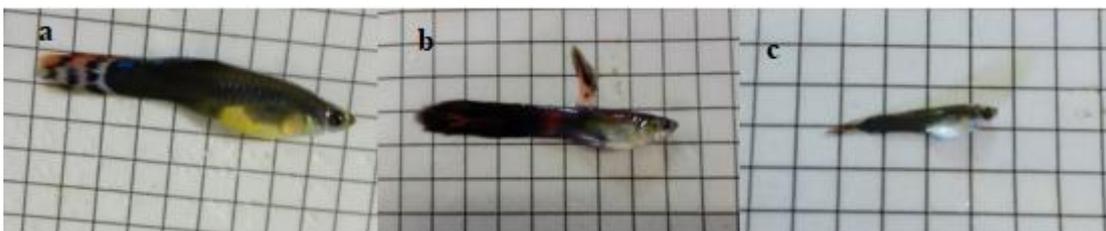
O mentol foi diluído em álcool etílico (99,8%). Para a preparação das soluções foi feita uma solução estoque, utilizando a proporção recomendada por Roubach e Gomes (2001), de 1g de mentol para 10 mL de etanol.

3.3 EXPERIMENTO 1: ANESTESIA COM MENTOL EM GUPPY

3.3.1 Animais

Para a realização do experimento foram utilizados 108 animais, divididos em três categorias: 32 fêmeas (comprimento total médio $2,66 \pm 0,09$ cm e peso total médio $0,229 \pm 0,02$ g), 32 machos (comprimento total médio $2,98 \pm 0,05$ cm e peso total médio $0,203 \pm 0,01$ g) e 32 filhotes (comprimento total médio $1,58 \pm 0,05$ cm e peso total médio $0,053 \pm 0,01$ g) de Guppy (*Poecilia reticulata*) (Figura 5). Foram considerados filhotes os animais que não apresentavam dimorfismo sexual, com idade em torno de 20 dias. Além desses, foram utilizados 4 animais de cada categoria para o controle etanol.

Figura 4: Exemplos de Guppy (*Poecilia reticulata*) utilizados no experimento. a) fêmea adulta; b) macho adulto e c) filhote.



Fonte: Arquivos pessoais.

3.3.2 Tratamentos

As induções anestésicas foram realizadas em recipientes de vidros de 0,5 L de capacidade de volume de água, onde foi diluído o anestésico a partir da solução estoque para atingir as concentrações finais de 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ de mentol. Para cada tratamento, foram utilizados oito espécimes de cada categoria, escolhidos aleatoriamente e submetidos, um de cada vez, às concentrações estabelecidas para o experimento.

Como o anestésico foi pré-diluído em etanol, um grupo controle do veículo (0,135%) foi realizado, expondo os animais (n= 4) ao maior volume de etanol presente na concentração de 200 mg L⁻¹ do anestésico.

Segundo Roubach e Gomes (2001) os animais devem atingir o estágio de anestesia profunda entre 1 a 3 minutos; e a recuperação deve ser rápida, sendo considerado adequado um tempo inferior a 5 minutos, após este período de tempo a dose anestésica pode tornar-se tóxica e provocar mortalidade nos animais. Portanto, seguindo esta recomendação, estabelecemos um tempo limite de exposição ao anestésico de 10 minutos.

Os tempos de indução foram cronometrados até que atingissem as diferentes fases de anestesia, de acordo com o Quadro 2 (OKAMURA et al., 2010). Foi considerado anestesiado o animal que apresentou ausência de reação a qualquer estímulo feito pelo toque na lateral dos peixes com um pincel, caracterizando a terceira fase de anestesia.

Quadro 2: Estágios de indução e recuperação anestésica em peixes.

Estágio	Indução	Recuperação
1	Movimento natatório reduzido, reação a estímulos externos e equilíbrio normal	Leve recuperação do movimento opercular e movimentos natatórios
2	Perda do movimento muscular e do equilíbrio, redução do movimento opercular e dos reflexos a estímulos externos	Recuperação do equilíbrio e leve reação a estímulos externos
3	Perda total dos reflexos a estímulos externos e movimento opercular quase ausente	Movimento e equilíbrio natatório normais

Fonte: Okamura et al. (2010)

Foi mensurado o comprimento padrão e total dos animais, durante o experimento, após a indução anestésica, para que os animais pudessem ser identificados durante a biometria que foi realizada posteriormente ao experimento.

Após o período de indução também foram observados os tempos de recuperação, onde os animais eram retirados da água e realocados no aquário de recuperação, contendo 10 litros de água limpa, livre de anestésico, com aeração constante. O tempo necessário para o aparecimento dos padrões comportamentais avaliados foi monitorado e registrado com auxílio de um cronometro digital.

Após o total restabelecimento dos animais (Quadro 2), os mesmos foram colocados em aquários contendo 12 litros de água, separados por tratamento (Figura 6), onde permaneceram durante 96 horas após o experimento, com aeração constante e alimentação, para monitoramento da sobrevivência.

Figura 5: Aquários pós-experimento. Aquário contendo 12 litros para monitoramento da sobrevivência



Fonte: Arquivos pessoais.

Durante o período experimental, a temperatura e o oxigênio dissolvido da água das unidades experimentais, foram monitorados de hora em hora com a utilização de um oxímetro digital.

Todos os procedimentos realizados durante o experimento foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da UNIPAMPA, sob o protocolo de número 002/2018.

3.3.3 Biometria

Após o período de monitoramento de 96 horas foi realizada a biometria (Figura 7) para mensurar peso; para tal os animais foram anestesiados com mentol na concentração de 200 mg L^{-1} , para serem pesados em uma balança analítica, com precisão de 3 casas decimais.

Figura 6: Biometria dos animais com auxílio de um paquímetro digital



Fonte: Arquivos pessoais.

3.4 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A ANESTESIA

Para avaliar o efeito da temperatura, foi definida a concentração de 100 mg L^{-1} de mentol, ou seja, a menor concentração capaz de induzir anestesia profunda nos animais, para que as variações comportamentais fossem mais detectáveis nos animais dos diferentes tratamentos. As concentrações mais elevadas poderiam mascarar o efeito da temperatura por serem mais eficazes. O protocolo de anestesia e recuperação foi o mesmo utilizado no experimento 1.

3.4.1 Animais

Para o experimento foram utilizadas 24 fêmeas adultas (comprimento total médio $4,26 \pm 0,06 \text{ cm}$ e peso total médio $0,836 \pm 0,04 \text{ g}$), 29 machos adultos (comprimento total médio $3,57 \pm 0,04 \text{ cm}$ e peso total médio $0,302 \pm 0,01 \text{ g}$) e 31 filhotes (comprimento total médio $1,77 \pm 0,03 \text{ cm}$ e peso total médio $0,061 \pm 0,003 \text{ g}$) de Guppy.

3.4.2 Tratamentos

Os animais, em suas respectivas categorias, foram aclimatados previamente à indução anestésica durante quatro dias em aquários contendo 10 litros de água nas temperaturas de 24°C, 27°C e 30°C, mantidas com termostatos.

Para cada tratamento foram utilizados 8 espécimes de fêmeas, e em média 10 espécimes de filhotes e machos, escolhidos aleatoriamente nos aquários de aclimação e submetidos, um a cada vez, à concentração de 100 mg L⁻¹ de mentol, em sua respectiva temperatura tanto na indução quanto na recuperação. Igualmente, durante a fase de monitoramento da sobrevivência, os animais foram mantidos nas respectivas temperaturas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade dos resíduos por Shapiro-Walk e no experimento 1, foi realizada ANOVA de duas vias (categoria, dose e interação entre as variáveis) e no experimento 2 também foi feita ANOVA de duas vias (categoria, temperatura e interação entre as variáveis), seguido pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Animais *outliers* foram excluídos da análise. Os dados são apresentados nas tabelas como média ± erro padrão da média.

RESULTADOS

3.6 EXPERIMENTO 1: ANESTESIA COM MENTOL EM GUPPY

Os animais expostos ao grupo controle (etanol) não apresentaram nenhum sinal de alteração comportamental, mesmo após período de 15 minutos.

Os pesos médios (Tabela 1) dos machos (210,50 mg) e filhotes (58,94 mg) não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) quando comparados com seu respectivo grupo, assim como o comprimento total médio (Tabela 1) das fêmeas (26,32 mm) e filhotes (16,52 mm). Em relação ao comprimento total médio dos machos (Tabela 1) houve diferença ($P<0,05$) entre as doses, o que poderia ser explicado pela variabilidade do tamanho da nadadeira caudal de cada animal.

Apesar de terem sido escolhidas aleatoriamente, houve a casualidade de os pesos das fêmeas serem diferentes entre as doses 50 e 200 mg L⁻¹. Esta diferença poderia ser pelo fato destas serem biologicamente maiores e mais pesadas que os machos, além de poderem estar em diferentes fases de desenvolvimento gonadal.

Tabela 1: Peso médio (em mg) e comprimento total médio (CT, em mm) dos guppies machos, fêmeas e filhotes expostos a diferentes concentrações de mentol.

Mentol (mg/L)	MACHOS		FÊMEAS		FILHOTES	
	Peso	CT	Peso	CT	Peso	CT
50	194,62±12,64	27,50±0,77 ^c	143,87±35,07 ^b	22,60±1,82	59,58±15,06	16,32±1,02
100	215,00±19,40	29,12±0,70 ^{bc}	185,00±24,59 ^{ab}	24,34±1,07	54,00±7,11	16,07±0,71
150	219,62±13,60	31,72±0,92 ^{ab}	277,78±46,53 ^{ab}	28,68±2,50	63,71±12,59	16,70±0,53
200	212,75±18,39	33,03±0,77 ^a	308,25±46,88 ^a	29,67±1,82	58,50±3,90	17,00±0,50

Valores médios ± erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

3.6.1 Análise dos resultados de anestesia nos machos

Os machos (Tabela 2) não atingiram o estágio de anestesia profunda (estágio 3), na dose de 50 mg L⁻¹ de mentol, permanecendo no estágio 2, ainda conscientes e respondendo a estímulos externos.

As concentrações de 100 a 200 mg L⁻¹ não diferiram (P>0,05) entre si em relação aos tempos para atingirem os estágios 1 e 2, porém para atingirem o estágio 3 de anestesia a dose de 100 mg L⁻¹ apresenta tempos maiores significativamente do que a dose de 200 mg L⁻¹. Já dose de 150 mg L⁻¹ permanece estatisticamente igual a ambas as doses.

Tabela 2: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de **machos** de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.

Mentol (mg/L)	INDUÇÃO			RECUPERAÇÃO		
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
50	4,13±0,74 ^a	7,92±1,02 ^a	10,00±0,00 ^a	1,38±0,31	1,97±0,35	3,17±0,42
100	0,88±0,12 ^b	1,57±0,17 ^b	2,76±0,20 ^b	0,90±0,09	1,82±0,12	2,99±0,28
150	0,70±0,03 ^b	1,36±0,18 ^b	2,14±0,17 ^{bc}	1,20±0,08	1,70±0,09	3,19±0,19
200	0,53±0,03 ^b	1,00±0,05 ^b	1,99±0,28 ^c	1,32±0,05	2,20±0,22	4,10±0,32

Valores médios ± erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Ao que se refere à sobrevivência, não houve mortalidade em nenhuma das concentrações, tanto durante o experimento como durante o período de monitoramento pós-experimento.

Em relação à recuperação (Tabela 2) não houve diferença significativa (P>0,05) entre as doses, nem mesmo com a dose de 50 mg L⁻¹ que não foi suficiente para que os machos atingissem a anestesia profunda.

3.6.2 Análise dos resultados de anestesia das fêmeas

O comportamento das fêmeas (Tabela 3) em todas as concentrações foi semelhante ao observado nos machos, onde a dose de 50 mg L⁻¹ não induziu a anestesia profunda, em um período de 10 minutos de exposição, no entanto, as fêmeas não atingiram o estágio 2, diferentemente dos machos; as demais doses não diferiram (P>0,05) entre si para os estágios 1 e 2. Porém, houve diferença para que os animais atingissem o estágio 3 de anestesia, sendo o menor tempo de indução observado na dose de 200 mg L⁻¹.

Tabela 3: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de **fêmeas** de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.

Mentol (mg/L)	INDUÇÃO			RECUPERAÇÃO		
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
50	8,13±1,25 ^a	10,02±0,81 ^a	10,00±0,00 ^a	0,18±0,18 ^a	0,34±0,34 ^a	3,17±0,89
100	0,87±0,05 ^b	1,70±0,15 ^b	3,91±0,23 ^b	1,10±0,13 ^b	1,80±0,14 ^b	2,69±0,22
150	0,54±0,04 ^b	0,94±0,06 ^b	2,05±0,12 ^c	1,00±0,11 ^b	1,44±0,09 ^b	2,00±0,17
200	0,42±0,02 ^b	0,69±0,03 ^b	1,23±0,07 ^d	1,27±0,14 ^b	1,82±0,20 ^b	2,73±0,40

Valores médios ± erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Como as fêmeas não atingiram o estágio de anestesia profunda ao serem expostas à concentração de 50 mg L⁻¹, os tempos de recuperação (Tabela 3) da referida dose devem ser desconsiderados, pois não representam a realidade da recuperação anestésica de animais profundamente anestesiados. No que se refere as demais doses não houve diferença significativa (P>0,05) entre as concentrações para os estágios 1 e 2 de recuperação.

Assim como nos machos, não houve mortalidade em nenhuma das etapas do experimento.

3.6.3 Análise dos resultados de anestesia dos filhotes

A menor concentração de (50 mg L^{-1}) de mentol induziu os filhotes (Tabela 4) a anestesia profunda, porém o tempo para tal efeito ultrapassou o recomendado pela literatura (ROUBACH e GOMES, 2001).

As concentrações de 100 e 200 mg L^{-1} diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre si em relação ao primeiro estágio de anestesia, permanecendo iguais ao longo dos demais estágios. A dose de 150 mg L^{-1} não diferiu das doses de 100 e 200 mg L^{-1} para todos os estágios de anestesia.

Tabela 4: Tempo (em minutos) de indução e recuperação de **filhotes** de Guppy expostos a diferentes concentrações de mentol.

Mentol (mg/L)	INDUÇÃO			RECUPERAÇÃO		
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
50	$1,62 \pm 0,19^a$	$3,74 \pm 0,24^a$	$8,90 \pm 0,59^a$	$1,17 \pm 0,20$	$1,91 \pm 0,28$	$4,71 \pm 1,50$
100	$0,78 \pm 0,07^b$	$1,40 \pm 0,12^b$	$3,00 \pm 0,63^b$	$1,20 \pm 0,32$	$1,73 \pm 0,38$	$2,79 \pm 0,46$
150	$0,51 \pm 0,06^{bc}$	$1,03 \pm 0,12^b$	$1,86 \pm 0,40^b$	$1,52 \pm 0,44$	$3,58 \pm 1,68$	$2,33 \pm 0,58$
200	$0,37 \pm 0,04^c$	$0,82 \pm 0,07^b$	$1,19 \pm 0,06^b$	$1,67 \pm 0,30$	$2,30 \pm 0,22$	$3,34 \pm 0,21$

Valores médios \pm erro padrão. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Ao que se refere aos tempos de recuperação, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações de mentol. Assim como nos adultos, não houve mortalidade durante o experimento e o período de monitoramento.

3.7 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A ANESTESIA

3.7.1 Análise dos resultados de indução anestésica de filhotes, fêmeas e machos

Durante a indução anestésica (Tabela 5) a temperatura de 30°C apresentou menores tempos para todas as categorias, em comparação a temperatura de 24°C.

Nos filhotes (Tabela 5), esse efeito é observado nos estágios 1 e 2 de indução, enquanto que no estágio 3 não houve diferença ($P>0,05$) entre as temperaturas. A temperatura de 27°C apresentou tempos intermediários, ora com resultados semelhantes à temperatura de 24°C, ora semelhantes à temperatura de 30°C. Todas as temperaturas testadas foram eficientes durante a indução anestésica de filhotes de Guppy.

Para as fêmeas (Tabela 5), as temperaturas de 27 e 30°C não diferiram entre si ($P>0,05$), apresentando os menores tempos de indução anestésica em todos os estágios de anestesia em comparação a temperatura de 24°C. As maiores temperaturas (27 e 30°C) foram eficientes durante a indução anestésica de fêmeas, enquanto que na menor temperatura (24°C) os animais atingiram a anestesia profunda, porém, apresentaram tempos além do limite considerado seguro para este procedimento, sendo que alguns espécimes nem chegaram ao estágio 3.

Assim como ocorreu nos filhotes e nas fêmeas a temperatura de 30°C também apresentou os menores tempos de indução anestésica para machos (Tabela 5), em comparação a de 24°C, porém este efeito só pode ser observado durante o primeiro estágio de indução, pois este se perde nos demais estágios, não havendo mais a influência da temperatura. A temperatura de 27°C não diferiu das demais temperaturas. Todas as temperaturas foram eficientes para a anestesia profunda de machos adultos de Guppy.

Em relação à sobrevivência, não houve mortalidade durante o experimento e o período de monitoramento, em nenhuma das categorias analisadas.

Tabela 5: Tempo (em minutos) de **indução anestésica** de filhotes, fêmeas e machos de Guppy expostos a diferentes temperaturas.

Temperatura	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
Filhotes			
24	0,56 ± 0,04 ^{ab}	1,10 ± 0,05 ^{ab}	2,81 ± 0,49 ^B
27	0,54 ± 0,04 ^{ab}	1,06 ± 0,05 ^a	2,36 ± 0,23 ^B
30	0,43 ± 0,03 ^b	0,80 ± 0,03 ^{bb}	1,91 ± 0,23 ^B
Fêmeas			
24	1,43 ± 0,11 ^{aA}	3,28 ± 0,28 ^{aA}	8,36 ± 0,90 ^{aA}
27	0,65 ± 0,06 ^b	1,31 ± 0,10 ^b	3,72 ± 0,48 ^{bA}
30	0,56 ± 0,06 ^b	1,15 ± 0,09 ^{bA}	3,28 ± 0,55 ^{bAB}
Machos			
24	0,78 ± 0,06 ^{ab}	1,47 ± 0,08 ^B	4,37 ± 0,34 ^B
27	0,62 ± 0,05 ^{ab}	1,24 ± 0,11	3,25 ± 0,28 ^{AB}
30	0,52 ± 0,05 ^b	1,25 ± 0,10 ^A	3,38 ± 0,41 ^A

Valores médios ± erro padrão. Letras minúsculas referem-se à comparação das temperaturas na mesma categoria, enquanto as letras maiúsculas referem-se à comparação entre as categorias, na mesma temperatura. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Comparando as categorias na mesma temperatura (Tabela 5) ficou evidente que os filhotes apresentam maior sensibilidade à anestesia em todas as temperaturas em relação aos adultos.

É possível observar esta diferença na temperatura de 24°C, onde os filhotes e os machos atingiram os três estágios de indução mais rapidamente do que as fêmeas. Já na temperatura de 27°C, nos estágios 1 e 2 de indução, não houve efeito da categoria, porém os filhotes atingiram o estágio 3 mais rapidamente do que as fêmeas; os machos permaneceram estatisticamente iguais a fêmeas e filhotes.

Na temperatura de 30°C o efeito da categoria é observado nos estágios 2 e 3 de indução, onde os filhotes apresentam os menores tempos em relação aos adultos. Durante o terceiro estágio de anestesia as fêmeas não diferem das outras categorias.

3.7.2 Análise dos resultados de recuperação anestésica de filhotes, fêmeas e machos

Durante a recuperação (Tabela 6) não houve efeito significativo ($P>0,05$) da temperatura para os filhotes.

Para as fêmeas (Tabela 6), a temperatura de 30°C apresentou os menores tempos para os estágios 2 e 3 de recuperação em relação a temperatura de 24°C; a temperatura de 27°C não diferiu entre as demais temperaturas nos estágios 2 e 3. No primeiro estágio não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as temperaturas.

Os machos (Tabela 6) apresentaram os menores tempos de recuperação na temperatura de 30°C em todos os três estágios em comparação a temperatura 27°C, ao invés da menor temperatura (24°C), que neste caso não diferiu das maiores temperaturas.

Tabela 6: Tempo (em minutos) de **recuperação anestésica** de filhotes, fêmeas e machos de Guppy expostos a diferentes temperaturas.

Temperatura	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
Filhotes			
24	0,86 ± 0,10	1,24 ± 0,13 ^B	2,08 ± 0,24
27	0,75 ± 0,06	1,23 ± 0,09 ^B	2,05 ± 0,25 ^B
30	0,72 ± 0,08	1,02 ± 0,07	1,56 ± 0,10
Fêmeas			
24	1,36 ± 0,45	2,24 ± 0,42 ^{aA}	3,05 ± 0,43 ^a
27	0,80 ± 0,19	1,26 ± 0,30 ^{abB}	1,91 ± 0,41 ^{abB}
30	0,48 ± 0,04	0,99 ± 0,10 ^b	1,57 ± 0,16 ^b
Machos			
24	0,92 ± 0,10 ^{ab}	1,50 ± 0,10 ^{abB}	2,74 ± 0,25 ^{ab}
27	1,24 ± 0,25 ^a	2,42 ± 0,49 ^{aA}	3,46 ± 0,48 ^{aA}
30	0,63 ± 0,09 ^b	1,07 ± 0,12 ^b	2,06 ± 0,34 ^b

Valores médios ± erro padrão. Letras minúsculas referem-se à comparação das temperaturas na mesma categoria, enquanto as letras maiúsculas referem-se à comparação entre as categorias, na mesma temperatura. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Na temperatura de 24°C os filhotes e os machos (Tabela 6) atingiram o segundo estágio de recuperação mais rapidamente do que as fêmeas; os estágios 1 e 3 não diferiram entre as categorias. Já na temperatura de 27°C os filhotes e as fêmeas atingem os estágios 2 e 3 de recuperação em tempos semelhantes, diferindo dos machos que apresentaram maiores tempos para atingirem os mesmos estágios.

Para a temperatura de 30°C não houve diferença significativa ($P>0,05$) para as categorias.

4 DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Anestesia com diferentes concentrações de mentol em Guppy

Considerando os resultados apresentados, pode-se afirmar que a concentração de 50 mg L⁻¹ não é recomendada para Guppy (*Poecilia reticulata*), independentemente de sexo e fase de desenvolvimento, pois esta não induz os indivíduos a anestesia profunda ou excede o tempo limite, expondo os animais ao risco de estresse e conseqüentemente a morte. Este efeito é corroborado pelos trabalhos de Cunha (2014); Hoshiba et al. (2015), Souza et al. (2012); Simões e Gomes (2009) e Gonçalves et al. (2008) que ao testarem adultos e filhotes de Guppy (*Poecilia reticulata*), juvenis de platy (*Xiphophorus maculatus*), juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus*), juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), respectivamente, observaram que a concentração de 50 mg L⁻¹ de mentol demonstrou ineficiência durante a indução anestésica, apresentando os maiores tempos para que os animais testados atingissem o estágio de anestesia profunda. Comparado com o eugenol, a dose de 50 mg L⁻¹ (GONÇALVES et al, 2008) provoca anestesia profunda nos animais, indicando que os resultados encontrados em estudos com mentol podem estar relacionados uma menor porcentagem de compostos anestésicos presentes no óleo essencial da menta.

As maiores concentrações de mentol testadas têm a capacidade de induzir guppies adultos e filhotes à anestesia profunda, sem provocar danos externos visíveis à saúde dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores (FAÇANHA e GOMES, 2005; MELLO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2011; SIMÕES e GOMES, 2009; PÁDUA et al., 2010) que testaram o anestésico em diferentes espécies de peixes comerciais, demonstrando a eficiência do mentol como anestésico a partir de concentrações mais elevadas.

Ao compararmos as três categorias de Guppy fica evidente que a maior dose (200 mg L⁻¹) apresenta, em todos os estágios, menores tempos de indução anestésica, comparado com a de 100 mg L⁻¹, inclusive havendo diferença significativa no estágio 3 para os adultos e no estágio 1 para os filhotes. Sugerindo que os filhotes são mais sensíveis a esta diferença de concentração no início da indução, muito provavelmente por causa do seu tamanho. A concentração de 200 mg L⁻¹ também apresenta os maiores tempos de recuperação apesar de não haver diferença significativa entre as doses, evidenciando uma possível resposta dose-dependente. Este efeito já era esperado e corresponde ao encontrado na literatura para

anestesia de peixes, tanto com anestésicos naturais, quanto para os químicos (BITTENCOURT et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013), pois quanto maior a concentração de anestésico no organismo, maior será o tempo para a eliminação total do mesmo. Além disto, Zahl et al (2009) explicam que ao anestésiar um peixe os efeitos colaterais são a diminuição da taxa respiratória e a redução do fluxo sanguíneo nas brânquias o que dificulta a eliminação do anestésico, conseqüentemente prolongando o tempo necessário para que o animal se recupere. Este efeito, segundo Prince e Powell (2000), pode ser, inclusive, desejável quando se trata de biometrias, cirurgias ou manejos de desova, visto que nestes procedimentos é fundamental que o animal continue sob efeito da anestesia por determinados períodos de tempo, mesmo após ser retirado da solução anestésica.

No presente estudo, a melhor concentração encontrada para anestesia de machos adultos é de 100 mg L^{-1} ; porém, para fêmeas e filhotes esta dose ultrapassou e/ou ficou no limite de tempo recomendado por Roubach e Gomes (2001) para anestesia, sendo preferível a dose de 150 mg L^{-1} na qual houve menores tempos de indução e recuperação anestésica. Portanto, de uma maneira geral, é recomendável a utilização da concentração de 100 mg L^{-1} em casos cujo objetivo é apenas uma sedação. Já a dose de 150 mg L^{-1} de mentol pode ser utilizada para anestesia de adultos e filhotes de Guppy, dado que esta dose foi suficiente para provocar anestesia profunda dentro do limite de segurança, assim como recuperou em menores tempos, em todas as categorias analisadas. Esta concentração de mentol destinada a anestesia corrobora os resultados encontrados por Cunha (2014), ao testar a mesma espécie de peixe com mentol.

Diferentemente dos guppies, para as três fases de desenvolvimento da tilápia-do-nylo, Teixeira et al (2011) recomendaram diferentes concentrações de mentol para alevinos (60 mg L^{-1}), juvenis (180 mg L^{-1}) e adultos (240 mg L^{-1}). Este fato pode ser explicado levando-se em conta a diferença de tamanho e peso entre as fases dos animais analisados, pois em peixes de corte esta diferença entre o alevino e o adulto é mais acentuada em comparação aos peixes ornamentais. De fato, segundo Delbon (2006), o tamanho corporal pode ser um dos fatores que influencia a resposta a anestesia de peixes, além do conteúdo de gordura, idade e sexo dos animais.

Ao estudar o mentol como anestésico de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*), Gonçalves et al. (2008) afirma que a substância anestésica possui grande margem de segurança, pois não provocou mortalidade nos animais testados; do mesmo modo que Façanha e Gomes (2005) analisando juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), mesmo após uma exposição prolongada (30 minutos) ao anestésico, e Simões e Gomes (2005), ao

testarem elevada concentração (500 mg L^{-1}) em juvenis de tilápia. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo com Guppy onde não foi observada mortalidade de animais. Portanto, a utilização de mentol como anestésico para peixes é segura e recomendada nas doses testadas, tanto para peixes ornamentais como para peixes de corte.

4.2 Experimento 2: Influência da temperatura durante a anestesia

Os resultados encontrados no presente estudo, demonstraram que na temperatura de 30°C os animais apresentaram os menores tempos para a indução anestésica, por se tratar de animais pecilotérmicos, a temperatura da água exerce grande influência na taxa metabólica destes (WATTS; MUNDAY; BURKE, 2002), que por sua vez afeta a taxa de ventilação das brânquias, responsáveis pela absorção do anestésico. Consequentemente, em temperaturas mais elevadas, a substância anestésica será rapidamente metabolizada (PRINCE e POWELL, 2000; ZAHL, SAMUELSEN, KIESSLING, 2012).

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Mylonas et al. (2005), testando Robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e Dourada (*Sparus aurata*) em temperaturas de 15 e 25°C , com eugenol e fenoxietanol, onde foi observado efeito negativo entre a temperatura e a resposta anestésica, ou seja, ao elevarem a temperatura da água o tempo de indução diminuiu. O mesmo efeito foi observado por Zahl et al. (2009) ao anestésiar Bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) em temperaturas de 8 e 16°C , com anestésicos químicos.

Similarmente aos resultados encontrados no presente estudo, Zahl et al. (2009) também observaram maior sensibilidade dos filhotes à anestesia independente da temperatura da água, ao testarem diferentes classes de peso do bacalhau-do- Atlântico. O efeito também foi observado por Souza et al. (2015) em alevinos, juvenis e adultos de ariacó (*Lutjanus synagrisi*) durante anestesia com eugenol e por Teixeira et al. (2011) testando mentol para diferentes classes de tamanho (alevino, juvenil e adulto) de tilápia do Nilo. Estes autores relataram que a resposta à anestesia nos animais foi proporcional à classe de tamanho, onde quanto maior o indivíduo mais resistente à anestesia. Segundo Tsantilas et al. (2006) este efeito está diretamente relacionado ao peso corporal e a área da superfície branquial. Porém, também é conhecido que animais em fases de desenvolvimento inicial possuem uma taxa metabólica basal superior se comparada com animais mais velhos. Desta forma, os filhotes possuem um metabolismo mais acelerado em relação aos adultos analisados neste trabalho; o

que provavelmente influenciou na rápida metabolização do anestésico pelos filhotes, até mesmo na temperatura de 24°C.

Por fim, ao serem analisados os tempos de indução, principalmente, nos adultos, fica evidente que a concentração de 100 mg L⁻¹ ultrapassa o limite de 3 min, não sendo recomendada para procedimentos que necessitem que o animal esteja em anestesia profunda. Nestes casos, a dose de 150 mg L⁻¹ seria a mais recomendada para as três categorias.

Em relação aos resultados referentes à recuperação encontrados neste trabalho, podemos afirmar que a temperatura também exerce influência nos tempos apresentados para este procedimento, pois estes são relativamente menores na temperatura de 30°C em comparação a temperatura de 24°C. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Mylonas et al. (2005), no qual independente do anestésico testado, os animais apresentaram tempos de recuperação menores na temperatura de 25°C em relação a menor temperatura analisada (15°C); e com Zahl et al. (2009), cujos animais analisados apresentaram os menores tempos de recuperação ao serem expostos à temperatura de 16°C. Este efeito, segundo os autores, pode estar relacionado com o aumento da demanda por oxigênio, provocado pela aceleração do metabolismo basal em altas temperaturas, o que eleva a taxa respiratória e auxilia na rápida eliminação da substância anestésica. Em contrapartida, a solubilidade do oxigênio diminui à medida que a temperatura da água se eleva, assim aumentando a necessidade de acelerar a respiração e o fluxo sanguíneo (ZAHN, SAMUELSEN, KIESSLING, 2012). Além disto, quanto menor for o tempo de exposição ao anestésico, menor será a quantidade absorvida do mesmo e mais rápida sua eliminação do organismo.

Portanto, podemos afirmar que existe uma relação inversamente proporcional entre a temperatura e os tempos de anestesia e recuperação; bem como uma relação diretamente proporcional em relação à idade do animal e os tempos de anestesia e recuperação. Sendo assim, o presente trabalho ressalta a importância de estes fatores serem considerados durante o manejo em uma propriedade.

5 CONCLUSÕES

- A concentração de 50 mg L^{-1} é insuficiente para a anestesia de Guppy (*Poecilia reticulata*).
- Recomenda-se a concentração de 100 mg L^{-1} para sedação, e a concentração de 150 mg L^{-1} para anestésias profundas de fêmeas, machos e filhotes de Guppy (*Poecilia reticulata*).
- Quanto maior a temperatura da água, menores os tempos de indução e recuperação anestésica de adultos e filhotes de Guppy.
- Os filhotes apresentam maior sensibilidade ao anestésico independente da temperatura.

6 REFERÊNCIAS

- ALVES, D. R. *et al.* Ocorrência de *Camallanus cotti* (nematoda: camallanidae) parasitando o Guppy, *Poecilia reticulata* (Osteichthyes: poeciliidae) no Brasil. **Revista da Universidade Federal Rural – Série Ciências da Vida**, v.22, p.77-79, 2000.
- BITTENCOURT, F. *et al.* 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.
- CARDOSO, R. S. *et al.* Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da Zona da Mata Mineira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, n.1, p.89-96, 2012.
- CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v.86, p.205-223, 2004.
- CUNHA, M. A. *et al.* Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v.10, n.10, p.2107-2114, 2010.
- CUNHA, M. A. *et al.* Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippi alba*. **Neotropical Ichthyology**, v.9, n.3, p.683-688, 2011.
- CUNHA, L. Óleo de cravo e mentol como anestésico para Guppy (*Poecilia reticulata*). Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2014.
- DELBON, M. C. **Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos da tilápia, *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Centro de Aquicultura da Unesp – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2006.
- DESCHAMPS, C. *et al.* Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mnetha cf. aquática* L. **Ciência e Natura**, UFSM, v.28, n.1, p.23-34, 2006.
- DINIZ, N. M.; HONORATO, C. A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo – Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.15, n.2, p.149-154, 2012.
- DUARTE, J. S.; HONORATO, C. A.; SANTOS, T.R. Tempo de indução e recuperação à anestesia do eugenol para beta (*Bettas splendens*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n.3-4, p.176-179, 2015.
- FAGUNDES, M. **Respostas fisiológicas do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) a estressores comuns na piscicultura**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Programa de Pós-graduação em Aquicultura – Universidade Estadual Paulista, Jabotical, 2005.

- FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v.35, n.1, p.71-75, 2005.
- FALCON, D. R. *et al.* Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamin C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperature. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.543-551, 2008.
- FARIA, P. M. C. *et al.* Aquicultura ornamental: um mercado promissor. **Panorama da Aquicultura**, p.24-37, 2016a.
- FARIA, P. M. C. *et al.* A legislação brasileira para o mercado de organismos aquáticos ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, 2016b.
- FARIA, C. F. A. *et al.* C. Caracterização do mercado de aquicultura ornamental e Aquariofilia no Rio Grande do Norte. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v.8, n.1, p.203-215, 2019.
- GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Bem estar animal: um conceito legítimo para peixes?. **Revista de Etologia**, v.8, n.1, p.51-61, 2006.
- GONÇALVES, A. F. N. *et al.* Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.
- GOMES, L. C. *et al.* Efficacy of benzocaine as na anesthetic in juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the world aquaculture society**, v.32, n.4, p.426-431, 2001.
- HOSHIBA, M. A. *et al.* Clove oil and menthol as anesthetic for platy. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, n. (esp), p.737-742, 2015.
- IGARASHI, M. A. *et al.* Potencial econômico do agronegócio da produção de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Belém, n. 42, p. 293-313, 2004.
- INOUE, L. A. K. A.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasil, 60 p., 2011.
- INOUE, L. A. K. A. *et al.* Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 2, p. 327-332, 2011.
- KING, W. *et al.* The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, v.36, n.14, p.1442-1449, 2005.

LOURES, B. T. R. R. *et al.* Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p.877-883, 2001.

LIMA, L. C. *et al.* Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.113-117, 2006.

MARTINS, L. P. C. **Comparação da sensibilidade de *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus helleri* a *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas aquariorum***. Dissertação (Mestrado em Aquacultura) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Portugal, p. 53, 2011.

MELLO, R. A. *et al.* Avaliação de 2-fenoxietanol e mentol como agentes anestésicos em tilápias. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, n.1, p.53-59, 2012.

MENDES, J. M.; INOUE, L. A. K. A.; JESUS, R. S. Influência do estresse causado pelo transporte e método de abate sobre o rigor mortis do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.18, n.2, p.162-169, 2015.

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

OKAMURA, D. *et al.* Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.971-976, 2010.

OLIVEIRA, R. F.; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleosteos e implicações para a piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.77-86, 2007.

PÁDUA, S. B. *et al.* Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Boletim do Instituto da Pesca**, v.36, n.2, p.143-148, 2010.

PIRES, B. S. **Influência da temperatura em juvenis de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.62, 2019.

PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v.20, p.1029-1032, 2000.

REBOUÇAS, P. M. *et al.* Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.2, n.2, p.35-42, 2014.

RIBEIRO, F. A. S. *et al.* Comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da Aqüicultura**, p. 54-59, 2008.

- RIBEIRO, P. A. P. *et al.* Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p.1136-1139, 2013.
- RIBEIRO, A. S. *et al.* Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.38, n.1, p.1-7, 2016.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v.11, n.66, p.37-40, 2001.
- ROTILLI, D. A. *et al.* Uso de eugenol como anestésico em pacu. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.3, p.288-294, 2012.
- ROMANELI, R. S. *et al.* Efficacy of benzocaine, eugenol, and menthol as anesthetics for freshwater Angelfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 30, n. 3, p.210-216, 2018.
- SANTOS, E. S. *et al.* Diferentes concentrações de eugenol na anestesia de molinésia *Mollienesia* sp. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.5, n.3, p.140-146, 2017.
- SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.4, p.1001-1017, 2009.
- SILVA, H. N. P. *et al.* Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural**, v.49, n.6, p.1-6, 2019.
- SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.613-620, 2009.
- SOUZA, R. A. R. *et al.* Efeito comparativo da benzocaína, mentol, e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. **Boletim do Instituto da Pesca**, v.38, n.3, p.247-255, 2012.
- SOUZA, R. L. M. *et al.* Eugenol como anestésico no manejo de ariacó *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758), cultivado. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.3, p.532-53, v.46, n.3, p.532-538, 2015.
- TAKAHASHI, L. S. *et al.* Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, n.4, p.469-475, 2006.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Anestesia com aspersão de *Lippia alba* nas brânquias de Pirarucu. **Comunicado Técnico da Embrapa**, Macapá, n. 138, p.2-3, 2015.
- TEIXEIRA, E. G. *et al.* Mentol como anestésico para diferentes classes de tamanho de tilápia do Nilo. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.2, p.75-83, 2011.
- TSANTILAS, H. *et al.* Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquaculture**, v.253, n.1-4, p.64-70, 2006.

WATTS, M.; MUNDAY, B. L.; BURKE, C. M. Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern Bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau): implications for aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.191-200, 2002.

WATANABE, C. H. *et al.* Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.76-86, 2006.

ZAHL, I. H. *et al.* Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v.295, n.1/2, p.52-59, 2009.

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