

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUNDIÁS
(*Rhamdia quelen*) ADAPTADOS A DIFERENTES NÍVEIS
DE pH, TEMPERATURA E DUREZA DA ÁGUA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diego Prestes Gomes

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) ADAPTADOS A DIFERENTES NÍVEIS DE pH,
TEMPERATURA E DUREZA DA ÁGUA**

por

Diego Prestes Gomes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração – Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)
ADAPTADOS A DIFERENTES NÍVEIS DE pH, TEMPERATURA E
DUREZA DA ÁGUA**

Elaborada por
Diego Prestes Gomes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)
(Presidente / Orientador)

Levy de Carvalho Gomes, Dr. (UVV)

Luciano de Oliveira Garcia, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de novembro de 2009

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, pelo esforço dispensado na minha formação profissional, pelo caráter e conhecimentos passados.

Ao meu irmão, pela amizade fiel e convívio nos momentos mais significativos de minha vida.

Aos meus avós (*in memoriam*) pela criação e ensinamentos herdados com a saudável convivência.

A minha sogra, pela amizade e colaboração afetiva, fatores importantes para concretização deste sonho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

As duas mulheres mais importantes da minha vida, a minha mãe por todo o desprendimento de sua vida para com a minha, por seu amor, incentivo, compreensão em todos os momentos inclusive nos mais difíceis; enfim por ser a melhor mãe do mundo. E a minha noiva, pela manifestação de amor e carinho nos momentos mais agradáveis de minha vida sentimental, acadêmica e profissional, fiel companheira e a verdadeira desbravadora deste projeto que visa obtenção deste título tão almejado e pelo amor incondicional que sinto por ela, enfim por simplesmente ser a Raquel.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Bernardo Baldisserotto pela orientação, dedicação, amizade e sensibilidade nas horas mais difíceis.

Aos colegas de laboratório Mauro, Luciano e Thaylise e em especial ao colega e amigo Alexssandro Geferson pelo auxílio e orientação nas práticas de laboratório e concretização do trabalho.

A Deus.

“Os conhecimentos nos dão meios para viver.

A sabedoria nos dá razões para viver”

Rubens Alves

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) ADAPTADOS A DIFERENTES NÍVEIS DE pH, TEMPERATURA E DUREZA DA ÁGUA

AUTOR: Diego Prestes Gomes

ORIENTADOR: Bernardo Baldisserotto

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de novembro de 2009.

Investigou-se os efeitos do pH, dureza e temperatura da água sobre a indução à anestesia e recuperação em jundiás expostos a diferentes concentrações de eugenol (20, 30 e 40 mg/L). Além disso, os efeitos da anestesia e temperatura sobre as pressões parciais dos gases sanguíneos (PvO_2 e $PvCO_2$) e pH foram também analisados em juvenis I ($3,5 \pm 0,7$ g; $7,7 \pm 0,8$ cm) e juvenis II ($152,2 \pm 3,4$ g; $26,6 \pm 3,3$ cm) de jundiá. A qualidade da água e o tamanho do peixe afetam a eficácia do eugenol em jundiá, principalmente nas menores concentrações testadas. A sedação desta espécie pode ser induzida com 20 mg/L, mas para a anestesia uma concentração de cerca de 40 mg/L de eugenol deve ser utilizada para reduzir a influência do tamanho do peixe e da qualidade da água. As pressões parciais dos gases sanguíneos e o pH foram afetados pelo eugenol durante a anestesia em peixes aclimatados a 30°C.

Palavras-chave: qualidade da água, gases sanguíneos, eugenol, sedação.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduate in Pharmacology

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

EUGENOL AS ANESTHETIC FOR SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) ADAPTED TO DIFFERENT pH, HARDNESS AND TEMPERATURE LEVELS OF THE WATER

AUTHOR: Diego Prestes Gomes

ADVISER: Bernardo Baldisserotto

Date and place of defense: Santa Maria, November 30th, 2009.

The effects of water pH, hardness and temperature on anesthesia induction and recovery in silver catfish exposed to different concentrations of eugenol (20, 30 and 40 mg/L) were investigated. Moreover, the effects of anesthesia and temperature on blood gases tensions (PvO_2 and $PvCO_2$) and pH were also analyzed in juveniles I (3.5 ± 0.7 g; 7.7 ± 0.8 cm) and juveniles II (152.2 ± 3.4 g; 26.6 ± 3.3 cm) of silver catfish. Water quality and fish size affect efficacy of eugenol in silver catfish, mainly in the lower concentrations tested. Sedation of this species can be induced even with 20 mg/L, but for anesthesia a concentration of at least 40 mg/L eugenol must be used to reduce the influence of the studied fish size and water quality. Blood gases tensions and pH were affected by eugenol anesthesia only in fish acclimated to 30 °C.

Keywords: water quality, blood gases tensions, eugenol, sedation.

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito

FIGURE 1 - PvO₂ (A), PvCO₂ (B) and blood pH (C) in silver catfish maintained at different water temperatures and after reaching anesthesia (stage IV) with eugenol, except those exposed to 20 mg/L eugenol at 30°C, which did not anesthetize and remained in the stage II for 20 min. All values are means ± S.E.M. Different letters indicate significant differences between the water temperatures in the same eugenol concentration (P < 0.05). * Indicate significant difference from the other eugenol concentrations in the same water temperature (P < 0.05) 46

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

TABLE 1 – Stages of anesthesia in fish (from Schoettger & Julin, 1967)	41
TABLE 2 – Sedation (SED) and anesthesia (ANE) induction times (s) in juveniles I of silver catfish exposed different eugenol concentrations and acclimated to different water pH, hardness and temperature	42
TABLE 3 – Recovery time (s) in juveniles I of silver catfish exposed different eugenol concentrations and acclimated to different water pH, hardness and temperature	43
TABLE 4 – Sedation (SED) and anesthesia (ANE) induction times (s) in juveniles II of silver catfish exposed different eugenol concentrations and acclimated to different water pH, hardness and temperature	44

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Exemplar de jundiá durante a avaliação dos estágios de sedação e anestesia induzidos por eugenol. Espécime mantido em caixa de fibra com aproximadamente 20 litros de água	57
APÊNDICE 2 – Amostragem de sangue em jundiá para a determinação do pH e das pressões parciais dos gases sanguíneos (PvO_2 e $PvCO_2$) através da utilização de seringas heparinizadas	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	14
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 Aplicação de anestésicos na piscicultura	16
4.2 Eugenol como anestésico	17
4.3 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	18
4.4 Estresse e parâmetros físico-químicos da água	19
4.5 Parâmetros sanguíneos	21
5 RESULTADOS	23
5.1 Manuscrito: Water quality parameters affect anesthesia induced by eugenol in silver catfish, <i>Rhamdia quelen</i>	23
Abstract	25
Introduction	26
Materials and Methods	27
Results	30
Discussion	32
Acknowledgements	35
References	35
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	57

1 INTRODUÇÃO

As inúmeras práticas realizadas na criação de animais aquáticos frequentemente expõem os peixes a uma gama de fatores estressantes, os quais afetam seu desempenho (BARTON, 2000). Qualquer estímulo ou estresse feito a um peixe causa uma ou mais mudanças fisiológicas e/ou de comportamento, e estas mudanças podem gerar diminuição da alimentação, conseqüentemente atraso no crescimento e mortalidade (BARTON, 1997). Portanto, utilizar métodos que minimizem as alterações fisiológicas dos peixes é durante transporte e manejo é interessante para aumentar o rendimento nas pisciculturas.

Um método que vem se mostrando eficaz para minimizar o estresse e danos físicos resultantes de manuseio e transporte de diferentes espécies de peixes é o uso de anestésicos. Em vista disso, vários produtos químicos têm sido empregados com o objetivo de imobilizar estes organismos, a fim de se prevenir acidentes e ferimentos na superfície do corpo dos animais, os quais poderiam ocasionar o surgimento de patógenos, aumentando assim a mortalidade (INOUE et al., 2005; CUNHA, 2007). O metanosulfonato de tricaína (MS-222), a quinaldina, o 2-fenoxietanol são compostos químicos amplamente utilizados em anestesia de peixes (MGBENKA & EGIOFOR, 1998; HOVDA & LINLEY, 2000; ROSS & ROSS, 2008). Porém, estes anestésicos são de difícil obtenção e apresentam alto custo (ROUBACH et al., 2001), além de apresentarem alguns efeitos colaterais como: perda de muco, irritação nas brânquias e olhos, e também alguns incômodos aos trabalhadores como a necessidade da utilização de luvas (INOUE, SANTOS NETO, MORAES, 2003). No Brasil não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos para peixes, então procura-se seguir as normas da FDA (Food and Drug Administration) que preconiza o uso do MS-222, porém este anestésico ainda não é produzido no Brasil e seu preço não é acessível.

Dessa forma justifica-se a necessidade de buscar alternativas seguras para procedimentos de anestesia em peixes nativos brasileiros no que se refere as concentrações, tempo de indução e recuperação anestésica. Além disso, preconiza-se a escolha de um protocolo de anestesia que deva estar relacionada sua viabilidade econômica, praticidade de uso e eficácia (CHO & HEALT, 2000).

Atualmente tem-se utilizado como alternativa segura e não onerosa para anestesia em peixes compostos isolados de plantas medicinais (CUNHA, 2007). Vários trabalhos sugerem que o óleo de cravo e outros óleos essenciais são alternativas efetivas na sedação de peixes, além de apresentarem benefícios quando comparados a outros métodos. O óleo de cravo, no

qual o principal constituinte de sua composição é o eugenol, foi reconhecido como anestésico efetivo para sedar e anestesiar peixes (SOTO & BURHANUDDIM, 1995; ANDERSON, McKINLEY, COLLAVECHIA, 1997). Por conseguinte uma série de estudos relataram o êxito em utilizar óleo de cravo como anestésico para várias espécies nativas brasileiras como matrinxã, *Brycon cephalus* (INOUE, SANTOS NETO, MORAES, 2003), tambaqui, *Colossoma macropomum* (ROUBACH et al., 2005), pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (VIDAL et al., 2006), jundiá, *Rhamdia quelen* (CUNHA, 2007), e dourado, *Salminus brasiliensis* (HISANO et al., 2008) bem como a capacidade desta substância em reduzir o estresse durante manejo e transporte (CUNHA, 2007; INOUE et al., 2005).

Neste trabalho foi utilizado o jundiá, espécie nativa comumente encontrada em águas do sul do Brasil e com ótimos resultados em condições de cativeiro (ZAIONS & BALDISSEROTTO, 2000; LOPES et al., 2001; TOWNSEND, SILVA, BALDISSEROTTO, 2003; COPATTI et al., 2005), tendo grande importância econômica no Rio Grande do Sul, pois é bem adaptada às condições climáticas e muito utilizada na piscicultura por ser um peixe com ótima aceitação pelo mercado consumidor. Informações sobre seu comportamento quando exposto ao eugenol em diferentes níveis de pH, dureza e temperatura da água e suas alterações na gasometria venosa e pH sanguíneo quando submetidos à ação deste componente, são de extrema relevância, pois existem poucos estudos de anestésicos nesta espécie, apenas com benzocaína (SEIGNEUR, 1984) e eugenol (CUNHA, 2007). Contudo, um estudo utilizando eugenol em diferentes temperaturas, dureza e pH da água ainda não foi realizado para esta espécie, embora existam estudos que analisam a eficácia do óleo de cravo e outros anestésicos em diferentes espécies peixes adaptadas a diferentes temperaturas (HOSKONEN & PIRHONEN, 2004; MEINERTZ et al., 2006; MYLONAS et al., 2005). A determinação da concentração adequada de eugenol em diferentes qualidades de água será uma ferramenta útil para piscicultores, os quais poderão evitar problemas na utilização deste produto. Além disso, a análise do efeito do eugenol na gasometria e pH sanguíneo é de fundamental importância porque permite verificar como este anestésico afeta os parâmetros fisiológicos desta espécie.

2 OBJETIVO GERAL

Verificar se a qualidade da água (pH, temperatura e dureza) afeta a eficácia do eugenol na anestesia e sedação de jundiás (*Rhamdia quelen*), determinando também o efeito da temperatura e do eugenol sobre a gasometria e pH sanguíneo.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se diferentes níveis de pH, dureza e temperatura da água interferem no tempo de indução e recuperação anestésica de juvenis de jundiás expostos ao eugenol.
- Verificar se diferentes temperaturas e o eugenol alteram a gasometria e pH sanguíneo de jundiás.
- Verificar se o tamanho do jundiá influencia no efeito do eugenol.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Aplicação de anestésicos na piscicultura

A piscicultura é uma atividade em ascensão no Brasil, pois além de movimentar o setor de produção alimentícia, gera uma fonte de renda satisfatória em vários segmentos. Para esta prática de cultivo atingir uma produção relevante com um mínimo de gastos é necessário que o piscicultor tenha conhecimentos de técnicas apropriadas de manejo, transporte e manutenção, pois os peixes são bastante sensíveis à ação de diversos fatores que podem causar estresse como: alimentação inadequada, transição entre normóxia-hiperóxia e hipoxia-normóxia, alteração na temperatura e baixa qualidade da água (BAGNYUKOVA et al., 2006), que podem inclusive ocasionar a morte.

Os peixes respondem ao estresse de forma proporcional à severidade e duração do estressor (BARTON, 1997). Estas respostas preparam o organismo para escapar dessa adversidade, concomitantemente, essas reações fisiológicas dos peixes frente a um estressor específico necessitam ser analisadas, tanto em relação à resposta quanto à intensidade do estressor (KRIGER–AZOLINI et al., 1989). Muitas dessas mudanças fisiológicas estão intrinsicamente relacionadas à resposta do animal frente ao estressor, incluindo a hematologia (DETHLOFF et al., 1999), osmolaridade e/ou balanço dos eletrólitos (McDONALD & MILLIGAN, 1997).

Frente às inúmeras fontes geradoras de estresse e buscando-se reduzir ao máximo estes fatores, tanto no âmbito comportamental quanto fisiológico é que se busca alternativas efetivas e viáveis para esses eventos; nesse aspecto a utilização de substâncias anestésicas tem sido uma valiosa ferramenta tanto na piscicultura, quanto na coleta e manejo de peixes.

Os anestésicos são agentes químicos ou físicos, que com o aumento da exposição ou concentração, primeiramente, sedam um animal; depois causam perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e das reações reflexas, por evitarem o início e condução do impulso nervoso (SUMMERFELT & SMITH, 1990). A avaliação dos diferentes estágios de anestesia que um agente anestésico para peixes pode induzir é bastante subjetiva e é difícil distinguir o exato instante da passagem de um estágio de sedação e/ou anestesia para outro (GILDERHUS & MARKING, 1987). Desta maneira devem-se avaliar fatores biológicos e ambientais ao comparar estudos referentes ao uso de anestésicos em peixes (BURKA et al., 1997; ROSS &

ROSS, 2008). Os fatores biológicos incluem a espécie, idade, tamanho, peso, condições fisiológicas e patogenicidade. Todos esses fatores afetam a taxa metabólica e conseqüentemente a farmacocinética das substâncias que compõem o anestésico. Os fatores ambientais como a temperatura e o pH também afetam o metabolismo dos peixes, e conseqüentemente aumentam ou diminuem a eficácia de um anestésico (BURKA et al., 1997; ROSS & ROSS, 2008).

O uso de anestésicos é de extrema importância para a piscicultura, pois reduz o estresse e a mortalidade durante manejo e transporte de peixes (GUEST & PRENTICE, 1982; ROSS & ROSS, 2008). Até o momento, entre os anestésicos utilizados e/ou em teste estão o óleo de cravo (SLADKY et al., 2001; INOUE, SANTOS NETO, MORAES, 2003; WAGNER et al., 2003; CUNHA, 2007), eugenol (ROUBACH et al., 2005; VIDAL et al., 2006, 2007a,b), o isoeugenol ou AQUIS (STEHLY & GINGERICH, 1999; SMALL, 2004; MEINERTZ et al., 2006), o metomidato (IVERSEN et al., 2003), o MS-222 (SEIGNEUR, 1984; SLADKY et al., 2001; PIRHONEN & SCHRECK, 2003; WAGNER et al., 2003), a benzocaína (SEIGNEUR, 1984; GOMES et al., 2001) e o mentol (GONÇALVES et al., 2008; FAÇANHA & GOMES, 2005).

4.2 Eugenol como anestésico

Na busca por alternativas seguras para anestesia de peixes, o óleo de cravo foi reconhecido como uma excelente alternativa em comparação aos anestésicos convencionais, pois trata-se de um óleo natural de uso assegurado (SOTO & BURHANUDDIN, 1995; ANDERSON, MCKINLEY, COLLAVECHIA, 1997; CUNHA, 2007).

O óleo de cravo é derivado da destilação de partes da planta do gênero *Eugenia* e tem como principal substância ativa o eugenol (2-metoxi-4-(propenil)-fenol) representando cerca de 70 a 98% de sua composição (ANDERSON, MCKINLEY, COLLAVECHIA, 1997) e está listado na Food and Drug Administration (FDA) na categoria de materiais considerados como seguros (ROSS & ROSS, 2008). O eugenol é um depressor do sistema nervoso central e utilizado principalmente em odontologia e medicina como anti-séptico, analgésico e anestésico (DAVIDSON et al., 2000).

O óleo de cravo possui ação efetiva em baixa concentração, reduz o estresse em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), sendo de baixo custo, fácil obtenção, além de ser uma mistura de substâncias orgânicas segura para o ambiente (IVERSEN et al., 2003). Vários

estudos comparam os efeitos fisiológicos do óleo de cravo, cujo componente principal é o eugenol, frente à anestésicos convencionais, entre eles o MS-222 e constataram um rendimento semelhante e perturbações fisiológicas mínimas frente a fatores estressantes externos (CHO & HEATH, 2000; SLADKY et al., 2001; WAGNER et al., 2003). Além disso, COOKE et al. (2004) relataram a utilização do óleo de cravo em baixas concentrações para o manejo e transporte por 60 minutos de juvenis de *Micropterus salmoides*. Vários outros trabalhos comprovaram a eficácia do óleo de cravo como anestésico para juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* (INOUE, SANTOS NETO, MORAES, 2003; VIDAL et al., 2007b), juvenis de piavuçu *Leporinus macrocephalus* (VIDAL et al., 2007a), alevinos de lambari *Astyanax altiparanae* (PEREIRA – DA – SILVA et al., 2009), rock bream *Oplegnathus fasciatus* (PARK et al., 2008), tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (VIDAL et al., 2008), dourado *Salminus brasiliensis* (HISANO et al., 2008), juvenis de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (VIDAL et al., 2006), juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (VIDAL et al., 2007a,b) e para transporte de matrinxã (INOUE et al., 2005).

4.3 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

A espécie em estudo, o jundiá, é muito utilizada em viveiros de piscicultura, encontrada em quase toda a América do Sul e Central, tendo uma distribuição neotropical, do sudeste do México até o centro da Argentina (GOMES et al., 2000).

A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza, sendo que a parte ventral do corpo é mais clara e a pigmentação da parte inferior da cabeça é variável, modificando a intensidade da sua coloração conforme alteração da luminosidade do ambiente onde habita, geralmente, em ambientes com mais iluminação sua coloração tende a ficar mais clara do que em ambientes escuros (BALDISSEROTTO & RADÜNZ-NETO, 2004).

O jundiá caracteriza-se por ser um peixe de couro, omnívoro e por responder positivamente a utilização de substâncias indutoras de desova, permitindo assim, a realização de reprodução em cativeiro. O comprimento máximo teórico calculado das fêmeas é de aproximadamente 66,5 cm e dos machos de 52,0 cm. O tempo de vida teórico estipulado também é superior nas fêmeas, 21 anos, enquanto nos machos é de apenas 11 anos. A espécie habita águas calmas com fundo de areia e lama, junto às margens de lagos e rios. Possui hábitos noturnos escondendo-se durante o dia entre pedras e troncos, saindo à noite para

alimentar-se. Os adultos possuem uma variada alimentação que inclui peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. As larvas alimentam-se de zooplâncton (BALDISSEROTTO & RADÜNZ-NETO, 2004).

No Brasil, conforme os dados estatísticos referentes ao ano de 2005, a produção de jundiás chegou a 2528 toneladas, colocando-a como quinta espécie nativa mais cultivada (BALDISSEROTTO, 2009), no entanto, nos últimos anos sua produção caiu consideravelmente (cerca de 660 toneladas; IBAMA, 2007). Na maioria dos países da América Latina onde os dados de produção precisos não estão disponíveis, uma vez que indicam somente “catfishes”, sendo impossível identificar quais espécies estão sendo levantadas (BALDISSEROTTO, 2003).

4.4 Estresse e parâmetros físico-químicos da água

A sobrevivência e o crescimento de jundiás, bem como de outros peixes depende de diversos fatores, tais como os níveis de oxigênio dissolvido na água, temperatura, pH, resíduos nitrogenados, manejo, transporte entre outros. Quando os peixes são submetidos à alteração de um destes fatores ocorrem modificações no seu metabolismo, o que constitui desvios da homeostase. Além disso, estes animais expressam um conjunto de respostas fisiológicas frente ao fator de estresse, que consiste no reconhecimento do estressor pelo sistema nervoso central, onde são observadas as reações hormonais do eixo hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI), com liberação das catecolaminas e do cortisol (BARTON & IWAMA, 1991). O aumento de catecolaminas e cortisol plasmático resulta em aumento da atividade cardíaca e respiratória, alterando a circulação e a capacidade de trocas gasosas nas brânquias. Além dessas alterações um forte desbalanço de Na^+ , Cl^- , K^+ e amônia plasmáticos pode ser evidenciado (MOMMSEN et al., 1999). Situações de estresse em peixes podem causar ainda uma demanda energética maior que a sustentável pelo metabolismo aeróbio, alterando inclusive o equilíbrio entre a produção das espécies ativas de oxigênio e os antioxidantes (IWAMA et al., 2004). Alguns estudos em peixes demonstraram que em situações de estresse ocorrem elevações do cortisol e glicose plasmáticos (DAVIS et al., 2003; SMALL, 2004; BARCELLOS et al., 2006). Estudos buscam também a interrelação entre o estresse fisiológico dos peixes e as condições de suas células (ACKERMAN et al., 2000; ZARATE & BRADLEY, 2003; IWAMA et al., 2004).

MEADE (1989) afirmou que uma aquicultura intensiva com boa produtividade requer a manutenção dos parâmetros físico-químicos da água. As variações de pH e dureza da água ocorrem no ambiente natural devido às condições do solo e do fitoplâncton que se encontra na água. O pH da água é normalmente regulado pelo sistema gás carbônico-bicarbonato-carbonato, ficando numa faixa de 6,0 a 8,0, a qual é encontrada com bastante frequência em águas do Rio Grande do Sul (BALDISSEROTTO, 2009).

ZAIONS & BALDISSEROTTO (2000) demonstraram que juvenis de jundiá não apresentam mortalidade significativa na faixa de pH de 4,0 a 9,0 (dureza de 30,0 mg/L CaCO_3) em 96 horas, e que a melhor faixa de pH para sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá se encontra entre 8,0 e 8,5 (LOPES et al., 2001). Juvenis de jundiá apresentam melhor crescimento em pH 7,5 que em pH 5,5 e 9,0 (COPATTI et al., 2005).

A dureza da água está relacionada a quantidade de cátions divalentes na água, principalmente Ca^{2+} e Mg^{2+} . O Ca^{2+} exerce um papel fundamental na regulação iônica porque influi na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o fluxo difusivo e altas perdas iônicas para a água (GONZALEZ et al., 1998). Os peixes absorvem o Ca^{2+} de alimentos ou da água, e este íon é essencial em vários processos biológicos: construção óssea, coagulação sanguínea, formação muscular e outras funções celulares (FLIK et al., 1995).

TOWNSEND & BALDISSEROTTO (2001) estudaram vários níveis de dureza da água e constataram que os mesmos não afetam a sobrevivência de juvenis de jundiá expostos ao pH 3,5; 4,0; 7,0 e 9,5 por 96 horas; entretanto o aumento da dureza em pH 3,75; 10,0 e 10,5 pode aumentar a sobrevivência destes juvenis. TOWNSEND, SILVA, BALDISSEROTTO(2003) relataram que a melhor dureza para a sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá encontra-se entre 30 e 70 mg/L.

A temperatura é um importante fator ecológico que afeta diretamente a sobrevivência dos peixes, havendo limites térmicos que são estabelecidos (TSUCHIDA, 1995). As temperaturas letais inferiores para juvenis de jundiá são 7,7 e 14,22°C e as superiores são 33,5 e 34,5°C em exemplares aclimatados a temperaturas de 16°C e 31°C, respectivamente (CHIPPARI-GOMES, GOMES, BALDISSEROTTO, 1999). Para larvas desta espécie com temperatura de incubação de 21 e 26°C, as temperaturas letais inferiores são 15,1 e 16,72°C e as superiores são 29,25 e 27,83°C, respectivamente(CHIPPARI-GOMES et al., 2000).

Alguns anestésicos podem alterar a qualidade da água. Por exemplo, o MS-222 diminui o pH da água (SYLVESTER & HOLLAND, 1982). Por outro lado, a qualidade da água pode alterar consideravelmente a eficácia do MS-222 e do etomidato, sendo que a indução e recuperação anestésicas sofrem maior alteração em altas temperaturas (BROWN,

1988). No camarão *Penaeus semisulcatus* o tempo de indução à sedação e/ou anestesia com óleo de cravo são alterados pela temperatura e salinidade da água (SOLTANI et al., 2004).

4.5 Parâmetros sanguíneos

Agentes anestésicos podem ter efeitos deletérios sobre os peixes. A hiperglicemia tem sido reportada após exposição ao MS-222 (HOUSTON & WOODS, 1972). Os valores de eritrócitos e trombócitos são significativamente alterados pela anestesia (HOFFMANN et al., 1982). Além disso, outras alterações a nível celular podem ser detectadas: hemoconcentração, redução no hematócrito, aumento de hemoglobina, redução de cálcio e aumento da alanina transaminase (ALT) (BROWN, 1988). Agentes anestésicos permitem que o dióxido de carbono possa ser mais facilmente excretado para a água, podem alterar o pH da água em ambientes confinados. Além disso, uma diminuição da turgidez dos eritrócitos é observada em peixes anestesiados. A turgidez dos eritrócitos pode ser devido ao aumento da pressão parcial de dióxido de carbono ($PvCO_2$), aumento da concentração de lactato, e uma redução na PvO_2 no sangue (SOIVIO & NIKINMAA, 1981).

Nos peixes, assim como nos mamíferos, verificam-se alterações nas curvas de dissociação de oxigênio e gás carbônico. No entanto, este efeito é muito mais acentuado em peixes do que em mamíferos, sendo que este mecanismo recebe o nome de efeito Root, o qual irá promover a liberação de O_2 a partir da hemoglobina para os tecidos respiratórios. Isto porque evidências *in vitro* mostraram que a difusão respiratória de CO_2 dentro dos eritrócitos de teleosteos ocorre mais rapidamente do que a liberação difusional de O_2 da hemoglobina, em resposta a uma alteração no gradiente de PvO_2 (BRAUNER & RANDALL, 1998; PELSTER & RANDALL, 1998). Conseqüentemente, uma queda transitória do pH nos eritrócitos seguida de uma hidratação catalisada de CO_2 pode elucidar o efeito Root e produzir altos valores de PvO_2 em tecidos aeróbicos bem vascularizados (McKENZIE et al., 2004).

Além disso, alterações nos parâmetros sanguíneos também podem ser regulados por hormônios, tais como as catecolaminas, as quais estão relacionadas com mudanças na pressão sanguínea. Em peixes, os quais não possuem glândula adrenal, as catecolaminas são secretadas a partir de um grupo de células cromafins distribuídas ao longo do sistema cardiovascular (NILSSON, 1983). Após serem secretadas na circulação, as catecolaminas podem ativar várias respostas metabólicas, respiratórias e cardiovasculares, amenizando os

efeitos detrimenais associados com agentes estressores agudos (RANDALL & PERRY, 1992; REID et al., 1998; PERRY & BERNIER, 1999; PERRY & GILMOUR, 1999; REID, 1999). Inúmeros estressores podem iniciar a secreção de catecolaminas em peixes, incluindo hipóxia (RISTORI & LAURENT, 1989), anemia (IWANA et al., 1987), acidose (BOUTILIER et al., 1986), exercícios exaustivos (PRIMMETT et al., 1986) e distúrbios físicos (RISTORI & LAURENT, 1985).

Recentemente, em truta arco-íris, quimiorreceptores branquiais de O₂ sensíveis à cianida foram relacionados a secreção sistêmica de catecolaminas (REID & PERRY, 2003). Estes receptores estão orientados tanto externamente quanto internamente e, desta forma, são potencialmente capazes de iniciar a secreção de catecolaminas quando ocorre uma redução de níveis de O₂ ora externamente (água) outrora internamente (sangue). Este aumento de catecolaminas eleva o transporte de O₂ sanguíneo através do aumento da capacidade de carregamento (WOODWARD, 1982; WELLS & WEBER, 1990) e melhora a afinidade de ligação Hb-O₂ via alcalinização dos eritrócitos (COSSINS & RICHARDSON, 1985; NIKINMAA, 2001) e reduções nos níveis intracelulares de trifosfato nucleosídeo (RANDALL & PERRY, 1992).

5 RESULTADOS

5.1 MANUSCRITO

WATER QUALITY PARAMETERS AFFECT ANESTHESIA INDUCED BY EUGENOL IN SILVER CATFISH, *Rhamdia quelen*

Artigo submetido ao periódico *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*

1 Water quality parameters affect anesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia*
2 *quelen*

3
4 Running title: Water quality affects anesthesia induced by eugenol in silver catfish

5
6 Diego Prestes Gomes, Brunele Weber Chaves, Alexssandro Geferson Becker, Bernardo
7 Baldisserotto*

8
9 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
10 Santa Maria, RS, Brazil.

11
12
13
14
15
16 * Author for correspondence:

17 Bernardo Baldisserotto

18 Departamento de Fisiologia e Farmacologia,

19 Universidade Federal de Santa Maria

20 97105.900, Santa Maria, RS, Brazil.

21 Phone: +55 –55-3220-9382 Fax: +55 –55- 3220-8241

22 E-mail: bernardo@smail.ufsm.br

23

1 ABSTRACT

2 This study investigated the effects of water pH, hardness and temperature on anesthesia
3 induction and recovery in silver catfish exposed to different concentrations of eugenol (20, 30
4 and 40 mg/L). Moreover, the effects of anesthesia and temperature on blood gases tensions
5 (P_{vO_2} and P_{vCO_2}) and pH were also analyzed in juveniles I (3.5 ± 0.7 g; 7.7 ± 0.8 cm) and
6 juveniles II (152.2 ± 3.4 g; 26.6 ± 3.3 cm) specimens of silver catfish. Water quality and fish
7 size affect efficacy of eugenol in silver catfish, mainly in the lower concentrations tested.
8 Sedation of this species can be induced even with 20 mg/L, but for anesthesia a concentration
9 of at least 40 mg/L eugenol must be used to reduce the influence of the studied fish size and
10 water quality. Blood gases tensions and pH were affected by eugenol anesthesia only in fish
11 acclimated to 30 °C.

12

13 *Key words:* blood gases tensions, eugenol, sedation, temperature

14

1 INTRODUCTION

2 Silver catfish (Quoy & Gaimard, 1824, Heptapteridae) occurs from southern Mexico to
3 Central Argentina, and is the native freshwater species most raised in southern Brazil
4 (Baldisserotto, 2004). It is a suitable species for fish culture because it has a good growth rate
5 and is able to use several nutrient sources (Lazzari *et al.*, 2006). This species can survive
6 acute water pH changes within the 4.0 – 9.0 range without significant mortality (Zaions &
7 Baldisserotto, 2000), but growth is reduced at pH 5.5 and 9.0 compared to 7.5 (Copatti *et al.*,
8 2005). Silver catfish juveniles can be transferred from soft water up to at least 600 mg
9 CaCO₃/L without mortality, and survival in very acidic or alkaline pH is improved by the
10 addition of Ca²⁺ to the water (Townsend & Baldisserotto, 2001). The best water hardness
11 range for larval growth and survival is 30 – 70 mg/L CaCO₃ (Townsend *et al.*, 2003; Silva *et*
12 *al.*, 2003, 2005). The mean water temperature in southern Brazil is 16 – 28 °C in summer and
13 14 – 17 °C in winter (Garcia *et al.*, 2008), within the temperature survival and growth range
14 for silver catfish (Chippari-Gomes *et al.*, 1999; Piedras *et al.*, 2004).

15 The handling of fish both in and out of their natural environment almost always
16 involves physical activity and affects their physiology and behavior (Tyler & Hawkins, 1981;
17 Ross & Ross, 2008). Operations involving a complete fish production cycle sometimes
18 involve vaccination, grading, handling, transport, and different disease or parasite treatments.
19 All these procedures can provoke a stress reaction (Iversen *et al.*, 2003) and is frequently
20 necessary to sedate or anaesthetize the fishes. Clove oil, obtained from the plant *Eugenia*
21 *aromatica*, and its main constituent, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl-phenol), have been
22 used to anesthetize fishes (Soto & Burhanuddin, 1995; Anderson *et al.*, 1997; Munday &
23 Wilson, 1997; Keene *et al.*, 1998; Cho & Heath, 2000; Sladky *et al.*, 2001; Tort *et al.*, 2002;
24 Woody *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Pirhonen & Schreck, 2003; Iversen *et al.*, 2003; Small,
25 2004).

1 Only a few studies analyzed the effect of temperature on the anesthetic capacity of clove
2 oil (Mylonas *et al.*, 2005), and the effect of water pH and hardness was verified only in the
3 efficacy of etomidate (Limsuwan *et al.*, 1983). Therefore, the aim of the present study was to
4 investigate the effects of water pH, hardness and temperature on the sedation and anesthesia
5 induction and recovery of silver catfish exposed to eugenol. Moreover, the blood gases
6 tensions (P_{vO_2} and P_{vCO_2}) and blood pH in silver catfish acclimated to different
7 temperatures and exposed to eugenol were investigated.

8 9 MATERIALS AND METHODS

10 *Experimental Animals*

11 Specimens of silver catfish were purchased from Bela Vista Fish Culture (Santa Maria,
12 RS, Brazil) and transported to the Laboratory of Fish Physiology at the Universidade Federal
13 de Santa Maria where they were maintained for two weeks in continuously aerated 250 L
14 tanks (temperature 21 ± 1 °C, pH 6.6 – 7.0, dissolved oxygen levels 5.8 – 7.2 mg/L). A 12-
15 hour-light: 12-hour-dark cycle was maintained. Fish were fed once a day with commercial
16 feed (Supra, 42% CP, Alisul Alimentos S.A., Carazinho, Rio Grande do Sul, Brazil) until
17 apparent satiety, up to 24h before the experiments. A semi-static system was used, with a
18 daily change of 30% of the water volume of the tank.

19 The water quality parameters were monitored during acclimation period and throughout
20 the experiments. Water dissolved oxygen and temperature were monitored with an oxygen
21 meter (model Y5512, YSI Inc., Yellow Springs, USA). The pH levels were verified with pH
22 meter DMPH-2 (Digimed, São Paulo, Brazil), total ammonia was determined according to
23 Boyd & Tucker (1992) and un-ionized ammonia (NH_3) according to Piper *et al.* (1982). Water
24 hardness was analyzed by the EDTA titrimetric method, alkalinity and nitrite according to
25 Boyd & Tucker (1992).

1 The Ethical and Animal Welfare Committee of the Santa Maria Federal University
2 approved the methodology used to this experiment.

3

4 *Experimental Series*

5 *Effect of water pH, hardness and temperature on anesthesia with eugenol and recovery*

6 After initial acclimation, juveniles I of the silver catfish (3.5 ± 0.7 g; 7.7 ± 0.8 cm) were
7 transferred to continuously aerated 40 L (250 L for different temperatures) tanks and kept for
8 15 days at:

9 1 - pH 5.0, 7.0 or 9.0, water hardness 20 mg CaCO₃/L, 23 °C

10 2 – water hardness 0, 20 or 120 mg CaCO₃/L, pH 7.5, 23 °C

11 3 - temperature 15, 23 or 30 °C, pH 7.5, water hardness 20 mg CaCO₃/L

12 Different groups of fish (in duplicate) were used for each treatment, and tank
13 management and feeding was performed as in the initial acclimation. The initial water pH was
14 changed to the experimental pH levels by adding H₂SO₄ (1 M) or NaOH (1 M) and the water
15 hardness increased by adding CaCO₃.2H₂O to the tanks in which the fish were placed.
16 Distilled water was considered zero (0) CaCO₃/L water hardness. Water temperature was
17 changed and maintained as described by Chippari-Gomes *et al.* (1999).

18 After the acclimation to their respective experimental water quality, fish were
19 transferred to aquaria containing 1 L of water and eugenol(Odontofarma[®], Porto Alegre,
20 Brazil) at concentrations (mg/L) of 20, 30 and 40, previously diluted in ethanol (1:20). The
21 time for sedation (stage II) and anesthesia (stage IV) induction were evaluated according to
22 Schoettger & Julin (1967) (Table 1). The maximum observation time was 30 min. After
23 induction, juveniles I were transferred to anesthetic-free aquaria to measure anesthesia
24 recovery time. All behavioral observations were evaluated and recorded by the same

1 investigator throughout the study. Eight juveniles were used for each concentration and water
2 quality parameter tested and each juvenile was used only once.

3

4 *Effect of temperature and eugenol anesthesia on blood pH, PvO₂ and PvCO₂*

5 Juvenies II of the silver catfish (152.2 ± 3.4 g; 26.6 ± 3.3 cm) were acclimated for fifteen
6 days to the temperatures of 15, 23 or 30 °C as described in the previous section. After that,
7 each fish was individually placed in 20 L tanks with 0 (control), 20 or 40 mg/L eugenol
8 previously diluted in ethanol (n = 8 per group). Time for sedation and anesthesia induction
9 were recorded, but not the recovery time because blood was collected after anesthesia
10 induction or at the end of 20 min if fish exposed to eugenol did not anesthetize. The control
11 fish experienced the same procedures and fish were hold tightly through blood sampling.
12 Mixed venous-arterial blood samples (1 to 1.5 mL) were collected from the caudal vein of
13 each fish using heparinized 3 mL syringes. This site is commonly used for collection of blood
14 samples in many species of fish, but because of the proximity of the artery and vein, samples
15 often are mixtures of venous and arterial blood, as reported by Sladky et al. (2001). The blood
16 samples were kept in ice and, the following variables were measured, using a clinical analyzer
17 (OMNI C 2413): pH, PvO₂ and PvCO₂. Measurements were corrected for water temperature
18 with the assumption that ambient water temperature and body temperature of each fish were
19 equivalent.

20 Data are reported here as means \pm SEM. The homogeneity of variances among groups
21 was tested with the Levene test. Time to sedation, anesthesia and recovery, blood gases
22 tensions and pH in all treatment groups were compared by one-way analysis of variance and
23 Tukey test or, when homogeneity of variances was not obtained, Kruskal-Wallis ANOVA
24 and the Mann-Whitney test were used. Analysis was performed using the software Statistica
25 ver. 5.1 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma), and the minimum significance level was set at $P < 0.05$.

1 RESULTS

2 In silver catfish time to sedation and anesthesia induction decreased and recovery time
3 from sedation and anesthesia increased with eugenol concentration, irrespective of water
4 quality and fish weight (Tables 2, 3 and 4). No fish died throughout the experiments.

5

6 *Effect of pH on sedation and anesthesia induction with eugenol and subsequent recovery*

7 The sedation induction time of silver catfish exposed to eugenol was significantly
8 higher in those kept at pH 5.0 than in those maintained at the other pHs, except 30 mg/L at pH
9 7.0 (Table 2). Anesthesia induction and subsequent recovery times were not affected
10 significantly by pH in fish exposed to 30 and 40 mg/L eugenol. Fish exposed to 20 mg/L
11 eugenol did not reach anesthesia (stage 4) within 30 min (see Table 2), but recovery time after
12 sedation with eugenol was significantly lowest in fish maintained at pH 5.0 (Table 3).

13

14 *Effect of water hardness on sedation and anesthesia induction with eugenol and subsequent* 15 *recovery*

16 The sedation induction time of silver catfish exposed to 20 and 30 mg/L eugenol were
17 significantly higher at hardness 0 mg CaCO₃/L than in those kept at other water hardness
18 (Table 2). Anesthesia induction time after exposure to 30 mg/L eugenol was significantly
19 higher in fish maintained at 0 mg CaCO₃/L followed by those kept at 120 mg CaCO₃/L. On
20 the other hand, in fish exposed to 40 mg/L eugenol the anesthesia induction time was
21 significantly higher in fish maintained at 20 mg CaCO₃/L than in those kept at 120 mg
22 CaCO₃/L (Table 2). The recovery time of fish submitted to 30 mg/L eugenol was significantly
23 higher in those maintained at 20 mg CaCO₃/L followed by 0 and 120 mg CaCO₃/L (Table 3).

24

1 *Effect of temperature on sedation and anesthesia induction with eugenol and subsequent*
2 *recovery*

3 There was a significantly highest sedation induction time in fish maintained at 30 °C
4 when exposed to 20 mg/L eugenol. Silver catfish exposed to 30 mg/L eugenol presented the
5 significantly lowest sedation induction time when maintained at 15 °C, but those exposed to
6 40 mg/L eugenol showed a significantly highest sedation induction time when kept at 23 °C.
7 Anesthesia induction time in fish exposed to 20 mg/L eugenol was significantly higher in
8 those maintained at 23 °C, but fish kept at this temperature presented significantly lowest
9 anesthesia induction time when exposed to 30 mg/L eugenol. Fish exposed to 40 mg/L
10 eugenol showed the lower anesthesia time with the higher temperature acclimation (Table 2).
11 The recovery time to sedation or anesthesia was significantly highest in fish maintained at 15
12 °C in all tested eugenol concentrations (Table 3).

13 Juveniles II of the silver catfish exposed to 20 and 40 mg/L eugenol showed
14 significantly highest sedation induction time when kept at 30 °C, and at this temperature fish
15 exposed to 20 mg/L eugenol did not reach stage 4 (anesthesia). On the other hand, the higher
16 the acclimation temperature showed the lower the anesthesia induction time (Table 4). The
17 P_{vO_2} was significantly lower in fish maintained at 23 °C compared to those kept at 30 °C
18 irrespective of the eugenol concentration (Fig. 1A). On the other hand, the P_{vCO_2} was
19 significantly lower in fish maintained at 15 °C compared to those kept at 23 °C in all eugenol
20 concentrations tested (Fig. 1B). Moreover, the P_{vO_2} and P_{vCO_2} of silver catfish kept at 30 °C
21 was significantly lowest and highest, respectively, in fish exposed to 40 mg/L eugenol (Figs.
22 1A, B). In addition, control fish and those exposed to 40 mg/L eugenol presented the
23 significantly highest blood pH at 15 °C (Fig. 1C).

24

25

1 DISCUSSION

2 The use of clove oil and eugenol as anaesthetics has been examined more closely in
3 recent years and some variation in efficacy amongst fish species and life stages were observed
4 (Endo *et al.*, 1972; Hikasa *et al.*, 1986; Soto & Burhanuddin, 1995; Anderson *et al.*, 1997;
5 Munday & Wilson, 1997; Keene *et al.*, 1998; Peake, 1998; Wagner *et al.*, 2002; Iversen *et al.*,
6 2003; Hoskonen & Pirhonen, 2004; Mylonas *et al.*, 2005). Silver catfish maintained at all
7 water quality analyzed in the present study showed lower sedation and anesthesia induction
8 times with increasing eugenol concentrations, but time to recovery had the opposite pattern,
9 with fish having a more rapid recovery when exposed to lower eugenol concentration. These
10 findings are agreement with those found in other species anesthetized with clove oil or
11 eugenol (Endo *et al.*, 1972; Hikasa *et al.*, 1986; Munday & Wilson, 1997; Keene *et al.*, 1998;
12 Woody *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2003; Hoskonen & Pirhonen, 2004).

13 Fishes maintained in different water quality parameters, such as salinity, pH, oxygen
14 level and water temperature could respond differently to a particular anesthetic concentration
15 (McFarland, 1959; Sylvester & Holland, 1982). Consequently, these variables are depending
16 on pharmacokinetic properties, where a short induction time indicates a fast uptake and
17 absorption and a long recovery time indicates a slow clearance and elimination (Zahl *et al.*,
18 2009). Sedation time to induction was shorter in silver catfish maintained at more alkaline pH,
19 and in most eugenol concentration the longest sedation and anesthesia time was observed in
20 fish kept at the lowest water hardness. There are no studies regarding the effect of pH and
21 water hardness on clove oil and eugenol efficacy, but these parameters had no or only slight
22 effect on the efficacy of etomidate in channel catfish *Ictalurus punctatus*, golden shiners
23 *Notemigonus crysoleucas*, and bluegills *Lepomis macrochirus* (Limsuwan *et al.*, 1983).

24 In general, induction to sedation and anesthesia times in silver catfish exposed to 20 and
25 30 mg/L eugenol were longer in those maintained at higher temperatures. However, fish

1 exposed to 40 mg/L eugenol showed faster time for sedation and anesthesia when acclimated
2 at higher temperatures. Recovery time of fish exposed to all eugenol concentrations were also
3 faster in fish acclimated to higher temperatures. A similar pattern was reported for European
4 seabass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to 25 – 60 mg/L clove oil (Mylonas *et al.*, 2005), and
5 all species studied by Hoskonen & Pirhonen (2004) showed faster time for sedation and
6 anesthesia to 40 mg/L eugenol in fish acclimated to higher temperatures. Moreover, faster
7 time for sedation and anesthesia to eugenol were observed in common carp, *Cyprinus carpio*
8 (Endo *et al.*, 1972; Hikasa *et al.*, 1986), and to clove oil in long finned eel *Anguilla*
9 *reinhardtii* (Walsh & Pease, 2002), and too AQUI-S (an isoeugenol-based anesthetic) in
10 rainbow trout (Stehly & Gingerich, 1999) acclimated to higher temperatures. Induction and
11 recovery times were generally shorter in Atlantic cod, *Gadus morhua*, exposed to benzocaine,
12 metacaine (MS-222), metomidate, and 2-phenoxyethanol at 16 °C compared to 8 °C (Zahl *et*
13 *al.*, 2009). The temperature-related effects of an anaesthetic could be explained by the
14 dependence of metabolic rate on temperature. The faster induction and recovery times at
15 higher water temperatures may be related to an increased oxygen demand due to increased
16 basal metabolism, and lower oxygen solubility, leading to enhanced respiration and blood
17 flow and thus accelerated physiologic processes involving absorption and elimination of the
18 anesthetics (Zahl *et al.*, 2009).

19 Earlier reports indicate that fish size does not have a clear unidirectional effect on the
20 required induction time to anesthesia (Houston & Woods, 1972; Akhlaghi & Mirab –
21 Brojerdi, 1999; Prince & Powell, 2000; Walsh & Pease, 2002; Woody *et al.*, 2002; Tsantilas
22 *et al.*, 2006), and a considerable variation exists within a species and especially between
23 species. Whitefish of larger size had shorter induction times to anesthesia with 40 mg/L clove
24 oil than smaller fish, but the opposite was observed in rainbow trout (Hoskonen & Pirhonen,
25 2004). It was observed in the present study that in most temperatures the sedation and

1 anesthesia induction times were higher in juveniles II of the silver catfish exposed to eugenol
2 than in juveniles I. This is in agreement with the fact that larger fish have smaller gill surface
3 area in relation to body weight, and consequently a smaller area for anesthetic diffusion (Zahl
4 *et al.*, 2009). In addition, juveniles II of the silver catfish probably have lower metabolic rate
5 (Bolner & Baldisserotto, 2007), which may also contribute to a slower rate of anesthetic
6 absorption.

7 Values of PvO_2 and $PvCO_2$ in silver catfish varied according to water temperature from
8 around 5.0 to 20.0 and 6.0 to 13.0 mmHg, respectively. Dourado, *Salminus brasiliensis*,
9 presented similar PvO_2 values (Souza *et al.*, 2001), but these values are highly variable from
10 species to species and also if is arterial or venous blood. Overall means of PvO_2 and $PvCO_2$ in
11 tambaqui, *Colossoma macropomum*, exposed to different water pH (3.0, 4.0, 5.0, and 6.5 at
12 28-30 °C) were around 40.0 and 5.0 mmHg, respectively (Wood *et al.*, 1998). Values of PvO_2
13 and $PvCO_2$ (4.93 and 12.73 mmHg, respectively) of silver catfish exposed to the highest
14 eugenol concentration (40 mg/L; 23 °C) were similar to those reported by Sladky *et al.* (2001)
15 for red pacu, *Piaractus brachipomus*, acclimated at 21.5 °C and exposed to 50 mg/L clove oil
16 (3.50 and 8.90 mmHg, respectively). Blood pH values of silver catfish were similar to those
17 reported for tambaqui (Wood *et al.*, 1998) and red pacu (Sladky *et al.*, 2001). Silver catfish
18 maintained at 23 °C (control and those exposed to 40 mg/L eugenol) presented significantly
19 higher $PvCO_2$ compared to those kept at 15 °C. This higher $PvCO_2$ at 23 °C would leave to
20 respiratory acidosis, what would explain the significantly lower blood pH. These findings are
21 in agreement with Sladky *et al.* (2001).

22 In conclusion, water quality and fish size affect efficacy of eugenol in silver catfish,
23 mainly in the lower concentrations tested. Sedation of this species can be induced even with
24 20 mg/L, but for anesthesia a concentration of at least 40 mg/L eugenol must be used to

1 reduce the influence of the studied fish size and water quality. Blood gases tensions and pH
2 were affected by eugenol anesthesia only in fish acclimated to 30 °C.

4 ACKNOWLEDGEMENTS

5 B. Baldisserotto and A. G. Becker received research and PhD fellowships, respectively,
6 from CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico).

8 REFERENCES

- 9 Akhlaghi, M. & Mirab-Brojerdi, M. (1999) Anaesthetic effect of clove tree and LC50
10 determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the Faculty of*
11 *Veterinary Medicine*, **54**, 52-57.
- 12 Anderson, W.G., McKinley, R.S. & Collavechia, M. (1997) The use of clove oil as an
13 anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American*
14 *Journal of Fisheries Management*, **17**, 301-307.
- 15 Baldisserotto, B. (2004) Silver catfish culture. *World Aquaculture*, **35**, 65-67.
- 16 Bolner, K.C.S. & Baldisserotto, B. (2007) Water pH and urinary excretion in silver catfish
17 *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, **70**, 50-64.
- 18 Boyd, C.E. & Tucker, C.S. (1992) Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture.
19 Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.
- 20 Chippari-Gomes, A.R., Gomes, L.C. & Baldisserotto, B. (1999) Lethal temperatures for silver
21 catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture*, **9**, 11-21.
- 22 Cho, G.K. & Heath, D.D. (2000) Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and
23 clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon
24 *Oncorhynchus tabawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, **31**, 537-546.

- 1 Copatti, C.E., Coldebella, I.J., Radünz Neto, J., Garcia, L.O., Da Rocha, M.C. &
2 Baldisserotto, B. (2005) Effect of dietary calcium on growth and survival of silver
3 catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH.
4 *Aquaculture Nutrition*, **11**, 345-350.
- 5 Endo, T., Ogishima, K., Tanaka, H. & Ohshima, S. (1972) Studies on the anaesthetic effect of
6 eugenol in some freshwater fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific
7 Fisheries*, **38**, 761-767.
- 8 Garcia, L.O., Copatti, C.E., Wachholz, F., Pereira Filho, W. & Baldisserotto, B. (2008)
9 Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, and its
10 implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, **6**, 275-281.
- 11 Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T. & Ogasawara, S. (1986) Anaesthesia and recovery
12 with tricaine methanesulfonate, eugenol and tripental sodium in the carp, *Cyprinus
13 carpio*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, **48**, 341-351.
- 14 Hoskonen, P. & Pirhonen, J. (2004) Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six
15 temperature-zone fishes. *Journal of Fish Biology*, **64**, 1136-1142.
- 16 Houston, A.H. & Woods, R.J. (1972) Blood concentrations of tricaine methane sulfonate in
17 brook trout, *Salvelinus fontinalis*, during anaesthetization, branchial irrigation, and
18 recovery. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **29**, 1344-1346.
- 19 Inoue, L.A.K.A., Santos Neto, C. & Moraes, G. (2003) Clove oil as anaesthetic for juveniles
20 of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, **33**, 943-947.
- 21 Iversen, M., Finstad, B., McKinlay, R.S. & Eliassen, R.A. (2003) The efficacy of metomidate,
22 clove oil, AQUI-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.)
23 smolts, and their potential stress – reducing capacity. *Aquaculture*, **221**, 549-566.

- 1 Keene, J.L.I., Noakes, D.L.G., Moocia, R.D. & Soto, C.G. (1998) The efficacy of clove oil as
2 an anesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*,
3 **29**, 89-101.
- 4 Lazzari, R., Radünz Neto, J., Emanuelli, T., Pedron, F.A., Costa, M.L., Losekann, M.E.,
5 Correia, V. & Bochi, V.C. (2006) Diferentes fontes protéicas para a alimentação do
6 jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, **36**, 240-246.
- 7 Limsuwan, C., Grizzle, J.M. & Plumb, J.A. (1983) Etomidate as an anesthetic for fish - its
8 toxicity and efficacy. *Transactions of the American Fisheries Society*, **112**, 544-550.
- 9 McFarland, W.N. (1959) A study of the effects of anaesthetics on the behavior and
10 physiology of fishes. *Publications of the Institute of Marine Sciences*, **6**, 22-25.
- 11 Meinertz, J.R., Greseth, S.L., Schreier, T.M., Bernardy, J.A. & Gingerich, W.H. (2006)
12 Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue
13 after exposure to AQUI-S (TM) at different temperatures, durations, and concentrations.
14 *Aquaculture*, **254**, 347-354.
- 15 Munday, P.L. & Wilson, S.K. (1997) Comparative efficacy of clove oil and other chemicals
16 in anesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish*
17 *Biology*, **51**, 931-938.
- 18 Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I. & Polzonetti-Magni, A. (2005) Comparative
19 efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European
20 sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different
21 temperatures. *Aquaculture*, **246**, 467-481.
- 22 Peake, S. (1998) Sodium bicarbonate and clove oil as potential anaesthetics of non-salmonid
23 fishes. *North American Journal of Fisheries Management*, **18**, 919-924.

- 1 Piedras, S.R.N., Moraes, P.R.R. & Pouey, J.L.O.F. (2004) Crescimento de juvenis de jundiá
2 (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. *Boletim do Instituto de Pesca*,
3 **30**, 177-182.
- 4 Piper, R.G., McElwain, I.B., Orme, L.E., McCraren, J.P., Fowler, L.G. & Leonard, J.R.
5 (1982) Fish Hatchery Management. United States Department of the Interior Fish and
6 Wildlife Service, Washington. 517pp.
- 7 Pirhonen, J. & Schreck, C.B. (2003) Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂
8 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*).
9 *Aquaculture*, **220**, 507-514.
- 10 Prince, A. & Powell, C. (2000) Clove oil as an anaesthetic of invasive field procedures on
11 adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, **20**, 1029-1032.
- 12 Ross, L.G. & Ross, B. (2008) Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, 2nd
13 ed. Blackwell, London, U.K. 159 pp.
- 14 Schoettger, R.A. & Julin, M. (1967) Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids.
15 Investigation of Fisheries Contribution, U.S. Department of Interior, **13**, 1–15.
- 16 Silva, L. V. F., Golombieski, J. I. & Baldisserotto, B. (2003). Incubation of silver catfish,
17 *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium
18 concentrations. *Aquaculture*, **228**, 279-287.
- 19 Silva, L.V.F., Golombieski, J.I. & Baldisserotto, B. (2005) Growth and survival of silver
20 catfish larvae, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), at different calcium and magnesium
21 concentrations. *Neotropical Ichthyology*, **3**, 299-304.
- 22 Sladky, K., Swanson, C., Stoskopf, M., Loomis, M. & Lewbart, G. (2001) Comparative
23 efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu
24 (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, **62**, 337-342.

- 1 Small, B.C. (2004) Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate
2 dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*,
3 **238**, 469-481.
- 4 Soto, C. & Burhanuddin, S. (1995) Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length a
5 weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, **136**, 149-152.
- 6 Souza, R.H.D., Soncini, R., Glass, M.L., Sanches, J.R. & Rantin, F.T. (2001) Ventilation, gill
7 perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei,
8 Characidae), exposed to graded hypoxia. *Journal of Comparative Physiology B*, **171**,
9 483-489.
- 10 Stehly, G.R. & Gingerich, W.H. (1999) Evaluation of AQUI-S (efficacy and minimum toxic
11 concentration) as fish anaesthetic-sedative for public aquaculture in the United States.
12 *Aquaculture Research*, **30**, 365-372.
- 13 Sylvester, J.R. & Holland, L.E. (1982) Influence of temperature, water hardness, and stocking
14 density on MS-222 response in three species of fish. *Progressive Fish-Culture*, **44**, 138-
15 141.
- 16 Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S. & Padros, F. (2002) Cortisol and hematological response
17 in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol.
18 *Aquaculture Research*, **33**, 907-910.
- 19 Townsend, C.R. & Baldisserotto, B. (2001) Survival of silver catfish fingerlings exposed to
20 acute changes of water pH and hardness. *Aquaculture International*, **9**, 413-419.
- 21 Townsend, C.R., Silva, L.V.F. & Baldisserotto, B. (2003) Growth and survival of *Rhamdia*
22 *quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness.
23 *Aquaculture*, **215**, 103-108.
- 24 Tyler, P. & Hawkins, A.D. (1981) Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: Hawkins,
25 A. D. (Ed), Aquarium Systems. New York, Academic Press.

- 1 Tsantilas, H., Galatos, A.D., Athanassopoulou, F., Prassinou, N.N. & Kousoulaki, K. (2006)
2 Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream,
3 *Diphodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture*, **253**,
4 64-70.
- 5 Wagner, E., Arndt, R. & Hilton, B. (2002) Physiological stress responses, egg survival and
6 sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine
7 methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, **211**, 353-366.
- 8 Walsh, C.T. & Pease, B.C. (2002) The use of clove oil as an anaesthetic for the long finned
9 eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research*, **33**, 1-9.
- 10 Wood, C.M., Wilson, R.W., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A. &
11 Val, A.L. (1998) Responses of an Amazonian teleosts, the tambaqui (*Colossoma*
12 *macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiological Zoology*, **71**, 658-670.
- 13 Woody, C.A., Nelson, J. & Ramstad, K. (2002) Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye
14 salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, **60**, 340-347.
- 15 Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B. & Hansen, M.K. (2009) Anaesthesia of Atlantic
16 cod (*Gadus morhua*) – Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body
17 weight, temperature and stress. *Aquaculture*, **295**, 52-59.
- 18 Zaions, M.I. & Baldisserotto, B. (2000) Na⁺ and K⁺ body levels and survival of fingerlings of
19 *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH.
20 *Ciência Rural*, **30**, 1041-1045.

1 **Table 1.** Stages of anesthesia in fish (from Schoettger & Julin, 1967)

Stage	Description	Behavioural response
1	Light sedation	Partial loss of reaction to external stimuli
2	Deep sedation	Partial loss of equilibrium, no reaction to external stimuli
3a	Total loss of equilibrium	Fish usually turn over but retain swimming ability
3b	Total loss of equilibrium	Swimming ability stops but responds to pressure on the caudal peduncle
4	Anesthesia	Loss of reflex activity, no reaction to strong external stimuli
5	Medullary collapse (death)	Respiratory movement ceases (death)

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

1 **Table 2.** Sedation (SED) and anesthesia (ANE) induction times (s) in juveniles I of silver
 2 catfish exposed different eugenol concentrations and acclimated to different water pH (units),
 3 hardness (mg CaCO₃/L) and temperature (°C).

	Eugenol (mg/L)					
	20		30		40	
	SED	ANE	SED	ANE	SED	ANE
pH						
5	162.8±4.3Aa	-----	82.2±4.2Ab	401.1±11.9Aa	62.4±2.2Ac	345.3±9.4Ab
7	142.4±3.1Ba	-----	90.3±5.1Ab	399.4±13.4Aa	47.8±4.1Bc	333.9±9.1Ab
9	109.3±1.5Ca	-----	48.4±1.2Bb	369.1±6.5Aa	45.5±4.9Bb	342.1±7.7Ab
Hardness						
0	83.2±3.5Aa	791.7±37.2Aa	63.1±2.7Ab	587.1±19.4Ab	40.6±1.7Ac	319.6±14.4ABc
20	48.7±2.7Ba	762.8±11.6Aa	48.9±2.9Ba	376.1±13.1Cb	40.9±2.1Aa	331.3±5.4Ac
120	58.6±2.8Ba	783.7±31.1Aa	49.7±3.4Ba	433.7±9.1Bb	37.2±2.6Ab	287.7±6.8Bc
Temperature						
15	42.1±2.1Ba	607.7±17.6Ba	28.6±1.2Bb	505.7±6.9Bb	25.9±1.1Bb	380.1±8.9Ac
23	48.7±2.7Ba	762.8±11.6Aa	48.9±2.9Aa	376.1±13.1Cb	40.9±2.1Ab	331.3±5.4Bb
30	62.1±4.3Aa	-----	45.7±2.2Ab	990.1±45.1Aa	31.2±1.9Bc	275.4±8.3Cb

4 Means ± SEM. Different capital letters indicate significant differences between the same
 5 water parameter (pH, hardness or temperature) at the same eugenol concentration (P < 0.05).
 6 Different lower case letters indicate significant differences between eugenol concentrations at
 7 the same water parameter (P < 0.05).

8

9

10

11

12

1 **Table 3.** Recovery time (s) in juveniles I of silver catfish exposed different eugenol
 2 concentrations and acclimated to different water pH (units), hardness (mg CaCO₃/L) and
 3 temperature (°C).

		Eugenol (mg/L)		
		20	30	40
	pH	Recovery times	Recovery times	Recovery times
	5	85.6±4.1Bc	119.6±1.9Ab	171.6±9.13Aa
	7	99.6±3.4Ac	125.4±4.3Ab	170.7±6.3Aa
	9	102.7±4.2Ac	119.5±2.2Ab	157.7±5.1Aa
	Hardness			
	0	96.9±6.5Ac	144.9±5.5Bb	215.9±7.1Aa
	20	82.1±4.1Ac	165.6±4.1Ab	216.9±6.8Aa
	120	88.4±4.3Ac	122.3±4.3Cb	225.9±4.8Aa
	Temperature			
	15	182.1±9.3Ab	272.9±15.8Aa	290.7±13.7Aa
	23	80.2±4.6Bc	155.6±7.9Bb	213.2±7.5Ba
	30	84.6±5.3Bc	115.1±3.7Cb	211.9±7.2Ba

4 Means ± SEM. Different capital letters indicate significant differences between the same
 5 water parameter (pH, hardness or temperature) at the same eugenol concentration (P < 0.05).
 6 Different lower case letters indicate significant differences between eugenol concentrations at
 7 the same water parameter (P < 0.05).

8

9

10

11

1 **Table 4.** Sedation (SED) and anesthesia (ANE) induction times (s) in juveniles II of silver
 2 catfish exposed different eugenol concentrations and acclimated to different water
 3 temperature (°C).

Temperature	Eugenol (mg/L)			
	20		40	
	SED	ANE	SED	ANE
15	70.2±2.2Ba	912.5±13.4Aa	54.3±1.7Bb	463.3±12.9Ab
23	72.3±2.5Ba	775.4±15.1Ba	42.7±1.2Cb	326.5±19.6Bb
30	103.8±4.5Aa	-----	68.5±3.4Ab	225.6±10.4C

4 Means ± SEM. Different capital letters indicate significant differences between the
 5 temperatures at the same eugenol concentration (P < 0.05). Different lower case
 6 letters indicate significant differences between eugenol concentrations at the same
 7 temperature (P < 0.05).

1 **Figure caption**

2 **Figure 1.** PvO_2 (A), $PvCO_2$ (B) and blood pH (C) in silver catfish maintained at different
3 water temperatures and after reaching anesthesia (stage IV) with eugenol, except those
4 exposed to 20 mg/L eugenol at 30 °C, which did not anesthetize and remained in the stage II
5 for 20 min. All values are means \pm S.E.M. Different letters indicate significant differences
6 between the water temperatures in the same eugenol concentration ($P < 0.05$). * Indicate
7 significant difference from the other eugenol concentrations in the same water temperature (P
8 < 0.05).

9

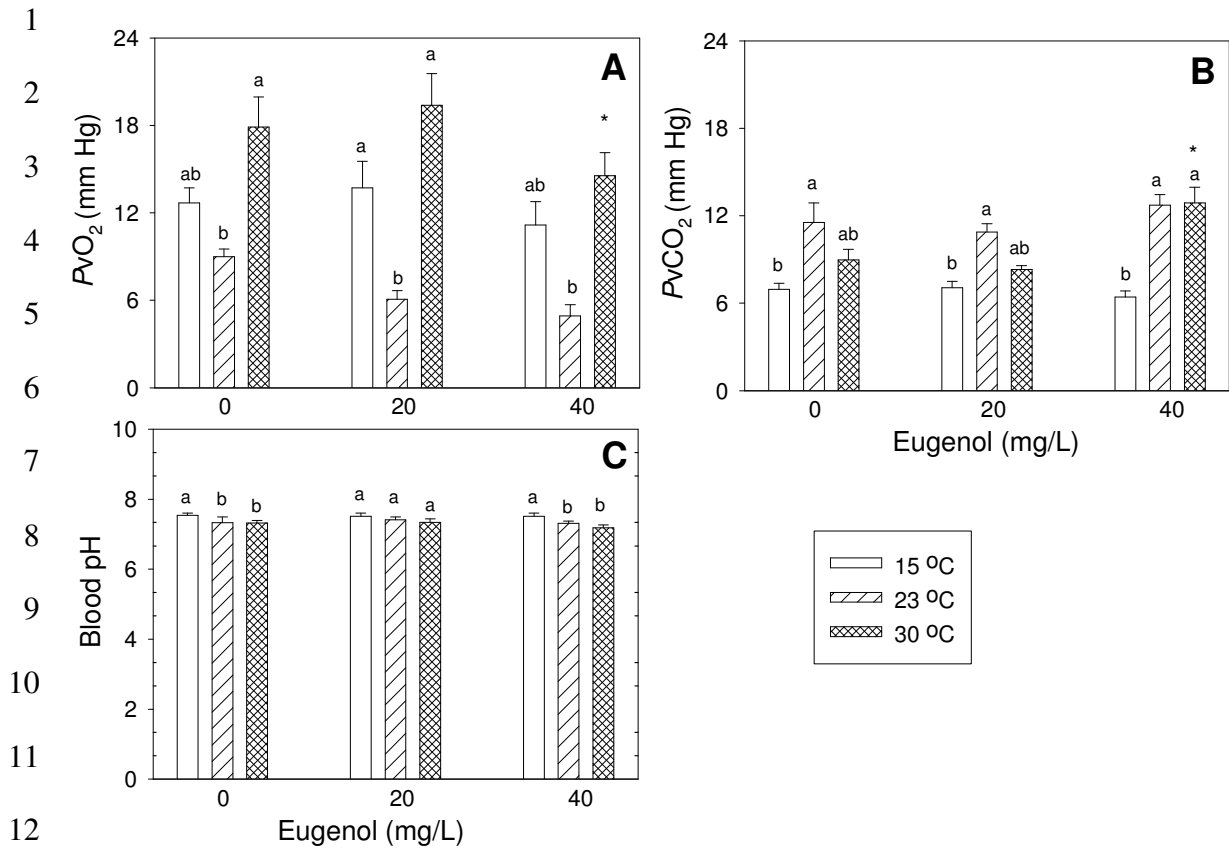


Figure 1

6 CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos apresentados neste estudo as principais conclusões são:

1. Os parâmetros da qualidade da água afetam a eficácia do eugenol em jundiás mantidos nas menores concentrações testadas.
2. As pressões parciais dos gases sanguíneos (P_{vO_2} e P_{vCO_2}) e o pH do sangue são afetados pela anestesia induzida com eugenol em jundiás aclimatados a 30°C.
3. O tamanho do jundiá afeta a eficácia do eugenol, principalmente nas menores concentrações testadas.
4. A sedação do jundiá pode ser induzida com 20 mg/L de eugenol, mas para a anestesia uma concentração de 40 mg/L deve ser utilizada para que a qualidade da água e o tamanho dos espécimens de jundiá não influenciem a eficácia deste anestésico.

REFERÊNCIAS

- AKHLAGHI, M.; MIRAB-BROJERDI, M. Anaesthetic effect of clove tree and LC50 determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**, v.54, p. 52-57, 1999.
- ACKERMAN, P. et al. Stress hormones and cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.23, p. 327-336, 2000.
- ANDERSON, W. G.; McKINLEY, R. S.; COLLAVECHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v.17, p. 301-307, 1997.
- BAGNYUKOVA, T. V. et al. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v.78, p. 325-331, 2006.
- BALDISSEROTTO, B. The emerging silver catfish culture in Latin America. **Aquaculture Magazine**, v.29, n.5, p. 36-40, 2003.
- _____. Silver catfish culture. **World Aquaculture**, v.35, p. 65-67, 2004.
- _____. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p. 291-299, 2009.
- BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2004. 232p.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v.253, p. 317-321, 2006.
- BARTON, B. A. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWANA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Org.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. v.62, p. 1-33.
- _____. Stress. In: STICKNEY, R. R. (Org.). **Encyclopedia of aquaculture**. New York: John Wiley and Sons, 2000. p. 892-898.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v.10, p. 2-26, 1991.
- BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. Water pH and urinary excretion in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, v.70, p. 50-64, 2007.

- BOUTILIER, R. G. et al. The promotion of catecholamine release in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, by acute acidosis: interaction between red cell pH and haemoglobin oxygen carrying-capacity. **The Journal of Experimental Biology**, v.123, p. 145-157, 1986.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, 1992.
- BRAUNER, C. J.; RANDALL, D. J. The linkage between oxygen and carbon dioxide transport. In: PERRY, S. F.; TUFTS, B. L. (Org.). **Fish Respiration**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 283-319.
- BROWN, L. A. Anesthesia in fish. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice – Tropical Fish Medicine**, v.18, n.2, p. 317-330, 1988.
- BURKA, J. F. et al. Drugs in salmonid aquaculture review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.20, p. 333-349, 1997.
- CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, p. 11-21, 1999.
- CHIPPARI-GOMES, A.R. et al. Lethal temperatures for *Rhamdia quelen*, larvae (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, n.6, p. 1069-1071, 2000.
- CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.31, p. 537-546, 2000.
- COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v.239, p. 509-529, 2004.
- COPATTI, C.E. et al. Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p. 345-350, 2005.
- COSSINS, A. R.; RICHARDSON, P. A. Adrenaline-induced Na⁺/H⁺ exchange in trout erythrocytes and its effects upon oxygen-carrying capacity. **The Journal of Experimental Biology**, v.188, p. 229-246, 1985.
- CUNHA, M.A. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Zootecnia – Produção Animal, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. 2007. 65p.
- DAVIDSON, G. W. et al. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui-SK. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.31, n.1, p. 105-114, 2000.

- DAVIS, K. B. et al. Effect of dietary cortisol on resistance of channel catfish to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus disease. **Aquaculture**, v.218, p. 121–130, 2003.
- DETHLOFF, G. M. et al. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.36, p. 415-423, 1999.
- ENDO, T.; OGISHIMA, K.; TANAKA, H.; OHSHIMA, S. Studies on the anaesthetic effect of eugenol in some freshwater fishes. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.38, p. 761-767, 1972.
- FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v.35, p. 71-75, 2005.
- FLIK, G. et al. Calcium transport processes in fishes. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. (Org.). **Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation**. 1995. v.14, p. 317-341.
- GARCIA, L. O.; COPATTI, C. E.; WACHHOLZ, F.; PEREIRA FILHO, W.; BALDISSEROTTO, B. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v.6, p. 275-281, 2008.
- GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v.7, p. 288-292, 1987.
- GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimeloidae). **Ciência Rural**, v.30, n.1, p. 179-185, 2000.
- GOMES, L. C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, p. 426-431, 2001.
- 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, p. 339-344, 2008.
- GONZALEZ, R. J. et al. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. **Physiological Zoology**, v.71, p. 15–22, 1998.
- GUEST, W. C.; PRENTICE, J. A. Transportation techniques for blueback herring. **Progressive Fish – Culturist**, v.44, p. 183-185, 1982.
- HIKASA, Y. et al. Anaesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and triptental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.48, p. 341-351, 1986.
- HISANO, H. et al. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, p. 303-307, 2008.

- HOFFMANN, R. et al. Influence of different anaesthetics and bleeding methods on hematological values in fish. **Archives of Fish Wiss**, v.33, p. 91-103, 1982.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperature-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v.64, p. 1136-1142, 2004.
- HOUSTON, A. H.; WOODS, R. J. Blood concentrations of tricaine methane sulfonate in brook trout, *Salvelinus fontinalis*, during anaesthetization, branchial irrigation, and recovery. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.29, p. 1344-1346, 1972.
- HOVDA, J.; LINLEY, T. J. The potential application for anesthesia in adult pacific salmon. **North American Journal of Aquaculture**, v.62, p. 67-72, 2000.
- IBAMA. Estatística da Pesca 2007 - Brasil. Grandes Regiões e Unidades da Federação. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/documentos/estatistica-pesqueira/>. Acesso em 07 jan. 2010.
- 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.
- INOUE, L. A. K. A. et al. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse da matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazonica**, v.35, n.2, p. 289-295, 2005.
- IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S (TM) and Benzoak (R) as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress – reducing capacity. **Aquaculture**, v.221, p. 549-566, 2003.
- IWAMA, G. et al. The effects of altering gill water flow on gas transfer in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v.65, p. 2466-2470, 1987.
- IWAMA, G. et al. Are haps suitable for indicating stressed states in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p. 15-19, 2004.
- KEENE, J. L. I. et al. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p. 89-101, 1998.
- KRIGER – AZOLINI, M. H. et al. Determinação dos indicadores endócrinos e metabólicos de estresse no manejo em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg. **Boletim Técnico do CEPTA**, v.2, p. 35-42, 1989.
- LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v.36, p. 240-246, 2006.
- LIMSUWAN, C.; GRIZZLE, J. M.; PLUMB, J. A. Etomidate as an anesthetic for fish - its toxicity and efficacy. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.112, p. 544-550, 1983.
- LOPES, J. M. et al. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.9, p. 73-80, 2001.

McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Org.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. v.62, p. 119-144.

McFARLAND, W. N. A study of the effects of anaesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Publications of the Institute of Marine Sciences**, v.6, p. 22-25, 1959.

McKENZIE, D. J. et al. The effects of sustained exercise and hypoxia upon oxygen tensions in the red muscle of rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p. 3629-3637, 2004.

MEADE, J. **Aquaculture Management**. New York: AVI Book, 1989. 175 p.

MEINERTZ, J. R. et al. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUIS (TM) at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, v.254, p. 347-354, 2006.

MGBENKA, B. O.; EGIOFOR, E. N. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. **Journal of Applied Aquaculture**, v.8, p. 73-80, 1998.

MOMMSEN, T. et al. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p. 211-268, 1999.

MUNDAY, P. L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **Journal of Fish Biology**, v.51, p. 931-938, 1997.

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 different temperatures. **Aquaculture**, v.246, p. 467-481, 2005.

NIKINMAA, M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. **Respiratory Physiology**, v.128, p. 317-329, 2001.

NILSSON, S. **Autonomic nerve function in the vertebrates. Zoophysiology**. New York: Springer-Verlag, 1983, v.13.

PARK, M. O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v.39, p. 877-884, 2008.

PEAKE, S. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anaesthetics of non-salmonid fishes. **North American Journal of Fisheries Management**, v.18, p. 919-924, 1998.

PELSTER, B.; RANDALL, D. J. The physiology of the root effect. In: PERRY, S. F.; TUFTS, B. L. (Org.). **Fish Respiration**. San Diego: Academic Press, 1998, p. 113-139.

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

PERRY, S. F.; BERNIER, N. J. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. **Aquaculture**, v.177, p. 285-295, 1999.

PERRY, S. F.; GILMOUR, K. M. Respiratory and cardiovascular systems. In: BALM, P. H. M. (Org.). **Stress Physiology**. Sheffield: Sheffield Academic, 1999. p. 52-107.

PIEDRAS, S. R. N.; MORAES, P. R. R.; POUHEY, J. L. O. F. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p. 177-182, 2004.

PIPER, R. G. et al. Fish Hatchery Management. United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington. 517pp, 1982.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.220, p. 507-514, 2003.

PRIMMETT, D. R. N. et al. The role of catecholamines in erythrocyte pH regulation and oxygen transport in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise. **The Journal of Experimental Biology**, v.122, p. 139-148, 1986.

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

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In: RANDALL, D. J.; HOAR, W. S. (Org.). **Fish Physiology: the cardiovascular system**. New York: Academic, 1992, v.XIIB, p. 225-300.

REID, S. G. Control of catecholamine secretion from fish chromaffin cells. In: VAL, A. L.; ALMEIDA – VAL, V. M. F. (Org.). **Biology of tropical fishes**. Manaus: INPA, 1999. p. 401-411.

REID, S. G. et al. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A**, v.120, p. 1-27, 1998.

REID, S. G.; PERRY, S. F. Peripheral O₂ chemoreceptors mediante humoral catecholamine secretion from fish chromaffin cells. **American Journal of Physiology Regulation and Integrative and Comparative Physiology**, v.284, p. R990-R999, 2003.

RISTORI, M. T.; LAURENT, P. Plasma catecholamines and glucose during moderate exercise in the trout: comparisons with bursts of violent activity. **The Journal of Experimental Biology**, v.44, p. 247-253, 1985.

RISTORI, M. T.; LAURENT, P. Plasma catecholamines in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during hypoxia. **The Journal of Experimental Biology**, v.48, p. 285-290, 1989.

ROOT, R. W.; IRVING, L. The effect of carbon dioxide and lactic acid on the oxygen combining power of whole and hemolysed blood of the marine fish, *Tautoga onitis*. **Biological Bulletin**, v.84, p. 207-212, 1943.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Blackwell Science**, Oxford, 2008. 159 p.

ROUBACH, R. et al. Safest level of tricaine methanosulfanate (MSS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica**, v.31, p. 159-163, 2001.

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

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, M. **Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids**. Investigation of Fisheries Contribution, U.S. Department of Interior, v.13, p. 1–15, 1967.

SEIGNEUR, G. N. Eficiência del MS 222, quinaldina y benzocaína como anestésicos em *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840). **Memorias del Asociación Latinoamericana de Acuicultura**, v.5, p. 633-639, 1984.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish larvae, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), at different calcium and magnesium concentrations. **Neotropical Ichthyology**, v.3, p. 299-304, 2005.

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

SMALL, B. C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v.238, p. 469-481, 2004.

SOIVIO, A.; NIKINMAA, M. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: PICKERING, A. D. (Org.). **Stress and Fish**. New York: Academic Press, 1981. p. 103-119.

SOLTANI, M. et al. Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. **Aquaculture International**, v.12, p. 457-466, 2004.

SOUZA, R. H. D. et al. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **Journal of Comparative Physiology - Part B**, v. 171, p. 483-489, 2001.

SOTO, C. G.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v.135, p. 149-152, 1995.

STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Evaluation of AQUI-S (efficacy and minimum toxic concentration) as fish anaesthetic-sedative for public aquaculture in the United States. **Aquaculture Research**, v.30, p. 365-372, 1999.

SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. Anesthesia, surgery and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Org.). **Methods for Fish Biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990, p. 213-272.

SYLVESTER, J. R.; HOLLAND, L. E. Influence of temperature, water hardness, and stocking density on MS-222 response in three species of fish. **Progressive Fish-Culture**, v.44, p. 138-141, 1982.

TORT, L. et al. Cortisol and hematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v.33, p. 907-910, 2002.

TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B.; Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**, v.9, p. 413-419, 2001.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p. 103-108, 2003.

TSANTILAS, H. et al. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diphodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquaculture**, v.253, 64-70, 2006.

TSUCHIDA, S. The relationship between upper temperature tolerance and final preferendum of Japanese marine fish. **Journal of Thermal Biology**, v.20, p. 35-41, 1995.

TYLER, P.; HAWKINS, A. D. Vivisection, anaesthetics and minor surgery. In: HAWKINS, A. D. (Ed), Aquarium Systems. New York, Academic Press, 1981.

VIDAL, L. V. O. et al. Utilização do eugenol como anestésico para manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystona corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, n.3, p. 275-279, 2006.

VIDAL, L. V. O. et al. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p. 357-362, 2007a.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p. 335-342, 2007b.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p. 1069-1074, 2008.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. (2002) Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v.211, p. 353-366, 2002.

WAGNER, G. N. et al. The ability of clove oil and MS – 222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v.34, p. 1139-1146, 2003.

- WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the long finned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, v.33, p.1-9, 2002.
- WELLS, R. M. G.; WEBER, R. E. The spleen in hypoxic and exercised rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v.77, p. 141–55, 1990.
- WOOD, C. M. et al. Responses of an Amazonian teleosts, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. **Physiological Zoology**, v.71, p. 658-670, 1998.
- WOODWARD, J. J. Plasma catecholamines in resting rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by high pressure liquid chromatography. **Journal of Fish Biology**, v.21, p. 429-432, 1982.
- WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p. 340-347, 2002.
- 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, p. 52-59, 2009.
- ZAIENS, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Na⁺ and K⁺ Body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p. 1041-1045, 2000.
- ZARATE, J.; BRADLEY, T. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture**, v.223, p. 175-187, 2003.

APÊNDICE 1 - Exemplar de jundiá durante a avaliação dos estágios de sedação e anestesia induzidos por eugenol. Espécime mantido em caixa de fibra com aproximadamente 20 litros de água.



APÊNDICE 2 - Amostragem de sangue em jundiá para a determinação do pH e das pressões parciais dos gases sanguíneos (PvO_2 e $PvCO_2$) através da utilização de seringas heparinizadas.

