



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TALISON CLEY DE CASTRO REIS

O POTENCIAL DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUVENIS DE
***Macrobrachim amazonicum* (HELLER, 1862)**

BRAGANÇA

2022

TALISON CLEY DE CASTRO REIS

**O POTENCIAL DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUVENIS DE
Macrobrachim amazonicum (HELLER, 1862)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado da Faculdade de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas Instituto de Estudos Costeiros, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Murilo Tenório Maciel.

Co-orientadora: Talia do Socorro Silva da Silva

BRAGANÇA

2022

TALISON CLEY DE CASTRO REIS

**O POTENCIAL DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA JUVENIS DE
Macrobrachim amazonicum (HELLER, 1862)**

Esta Monografia de Conclusão de Curso foi julgada para outorgar o Título de Licenciado Pleno em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Biológicas do Instituto de Estudos Costeiros/Universidade Federal do Pará.

DATA DA AVALIAÇÃO 25/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Murilo Tenório Maciel - Titular
Orientador - UFPA

Talia do Socorro Silva da Silva - Titular
Co-orientadora - UFPA

Me. Gabriel Monteiro de Lima - Titular
UFPA/Bragança

Janieli do Socorro Amorim da Luz - Titular
UFPA/Bragança

BRAGANÇA
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades. Aos meus pais, Antônio e Lucineide pelo amor, incentivo e apoio incondicional, e por me ajudarem a poder me manter em outra cidade longe da família.

Minha namorada Singreed Arícia que sempre acreditou no que eu era capaz, minha amada, sou muito grato por seu apoio e amor, sem você este TCC não teria terminado, obrigado por sua gentileza e compreensão mesmo com minha ausência em diferentes momentos, e sua mãe Marcia Cristina que me acolheu como um filho, obrigado a vocês e toda sua família. Ao meu amigo e patrão, Rogerio Dantas que me apoiou em diversos momentos, e a todos da Odonto-lab.

Ao professor Dr. Carlos Murilo Tenório Maciel, pela orientação, apoio e confiança. Juntamente com a co-orientadora Talia do Socorro Silva da Silva, e a professora Dra. Cristiana Maciel. A todos os meus amigos, particularmente Gabriel Monteiro de Lima que me ajudou muito no processo de escrita, e pelas diversas dicas, e aos momentos de descontração durante o *coffee break*, meus sinceros agradecimentos. Vocês desempenharam um papel significativo no meu crescimento, e devem ser recompensados com minha eterna gratidão.

A Universidade Federal do Pará (UFPA), ao instituto de estudos costeios (IECOS), a Faculdade de Ciências Biológicas (FABIO), ao *Campus* universitário de Bragança e aos Laboratórios LAQUA e BioData por me ceder toda a estrutura necessária a construção desse trabalho científico.

Lista de figuras

Figura 01: Marcadores pretos indicam a distribuição de espécies de <i>M. amazonicum</i> na América do Sul da Argentina à Venezuela, marcadores listrados representam áreas onde as espécies estão ausentes e áreas cinzas indicam o potencial socioeconômico da espécie.....	6
Figura 02: Um espécime de <i>M. amazonicum</i> apresenta propriedades morfollogicamente reconhecíveis da espécie. Ilustração adaptada de PANTALEÃO et al., 2014.	7
Figura 03: Árvore de cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>). Fonte: BERAUD / BSIP / SCIENCE PHOTO LIBRARY.....	11
Figura 04: Eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂) - Estrutura, Massa Molecular, Propriedades e Usos. Disponível em: https://byjus.com/chemistry/eugenol/	12
Figura 05: Eugenol adquirido para o uso durante o experimento. Disponível em: https://www.utilidadesclinicas.com.br/eugenol-biodinamica-bio3619a.htm	12
Figura 06: (a) Pontos de coleta das matrizes (gêmeas ovígeras) no Estuário do Rio Caeté, na comunidade do Camutá (P1), e (b) a forma que os animais foram capturados.	14
Figura 07: Delineamento experimental das diferentes concentrações de eugenol testadas para verificação em juvenis de <i>M. amazonicum</i>	16
Figura 08: (A) efeito de exposição a diferentes concentrações de eugenol (250, 500, 1000 e 2000µL/L) em juvenis de <i>M. amazonicum</i> , evidenciando o tempo necessário para alcance dos estágios de anestesia (I e II) e recuperação. Letras diferentes para cada linha foram utilizadas quando ocorreu diferença estatística entre as concentrações testadas (Kruskal-Wallis). As médias das colunas das diferentes concentrações com letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05). (B) Mostra o registro do número de mortes para cada concentração usada durante os testes com Eugenol, as quais ocorreram com tempo inferior a 24 horas após o banho anestésico.....	21

Lista de tabelas

Tabela 01: A tabela mostra a eficiência de OEs de cravo (eugenol) como anestésicos em diferentes camarões.....	13
Tabela 02: Médias dos tempos de indução e recuperação da anestesia (Média $\pm$ desvio padrão) do eugenol aplicado em banho anestésico para juvenis de <i>M. amazonicum</i> . NA corresponde a evento que não foi observado no durante o tempo de 15 min, Letras diferentes para cada linha foram utilizadas quando ocorreu diferença estatística entre as concentrações testadas.....	18
Tabela 03: valores individuais de cada concentração.....	29

Sumário

1. Introdução.....	7
1.1 Estresse durante o cultivo	8
1.2 Anestésicos.....	10
1.3 Óleos essenciais como anestésicos.....	10
1.4 <i>Syzygium aromaticum</i>	11
2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. Material e Métodos	14
3.1 Obtenção dos animais.....	14
3.2 Indução a anestesia de curta duração em adultos de <i>M. amazonicum</i>	15
4. Resultados e Discussão.....	16
5. Conclusão.....	22
6. Referências bibliográficas	23
7. Anexo.....	30

RESUMO

Os óleos essenciais são substâncias cada vez mais empregadas na aquicultura. São usados para minimizar do estresse durante a rotina de cultivo. O eugenol é um componente majoritário encontrado no óleo essencial de cravo. Ele vem sendo empregado, em várias espécies de importância econômica, nos tratamentos como anestésico natural. Apesar de que o *Macrobrachium amazonicum* ser uma espécie nativa com grande potencial para carcinicultura de água doce, entretanto, a utilização de óleos essenciais ainda é pouco explorada no grupo de pesquisa. O presente estudo se propôs a verificar os efeitos de diferentes concentrações do eugenol em juvenis de *M. amazonicum*. O experimento foi conduzido com uso de quatro concentrações do óleo (250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{L/L}$), testado em 10 réplicas biológicas para cada tratamento. Os animais foram observados por um período de 30 minutos, com registro dos estágios de sedação leve (EI), anestesia profunda (EII) e recuperação. Dentre as concentrações testadas, 500 $\mu\text{L/L}$ respondeu de forma mais eficiente na indução aos estágios EI e EII, além alto percentual de recuperação dos animais. A concentração 250 $\mu\text{L/L}$ não apresentou números significativos de indução à anestesia profunda, enquanto as concentrações mais altas resultaram em altas taxas de mortalidade (1000 $\mu\text{L/L}$ = 50%; 2000 $\mu\text{L/L}$ = 70%). Para os camarões *Macrobrachium rosenbergii* e *Farfantepenaeus brasiliensis*, foram obtidos resultados similares. Dessa forma, o presente estudo sugere que o eugenol pode ser empregado na espécie *M. amazonicum*, para indução aos estágios anestésicos EI e EII, utilizando concentrações inferiores a 500 $\mu\text{L/L}$.

Palavras-chave: Camarão-da-amazônia, Óleo Essencial, *Syzygium aromaticum*.

1. Introdução

O *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) foi introduzido pela ação humana no alto Paraná (MAGALHÃES et al., 2005), apresentando uma vasta distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde a Venezuela até a Argentina, estando ausente apenas no Chile, Uruguai e Equador (Figura 01) (HOLTHUIS, 1952; MELO, 2003). Ocorre nas bacias hidrográficas do Amazonas, Araguaia-Tocantins, Orinoco, São Francisco e La Plata (MACIEL; VALENTI, 2009; VERGAMINI et al., 2011; ANGER, 2013). Sendo popularmente conhecido como camarão da Amazônia (*Amazon river prawn*), camarão cascudo, fantasma ou sossego.

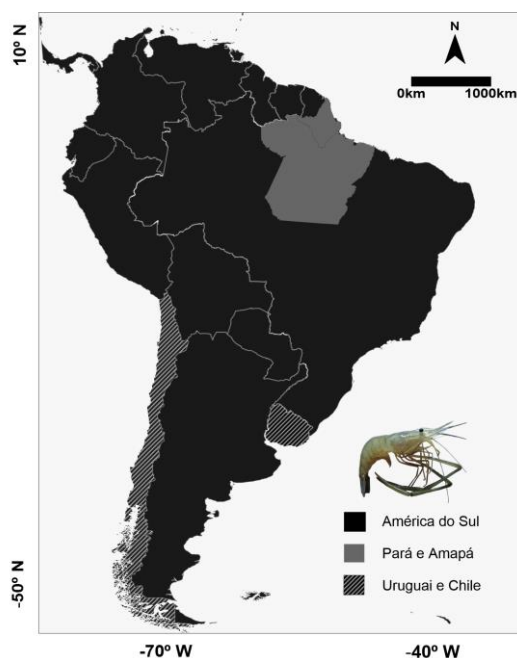


Figura 1: Marcadores pretos indicam a distribuição de espécies de *M. amazonicum* na América do Sul da Argentina à Venezuela, marcadores listrados representam áreas onde as espécies estão ausentes e áreas cinzas indicam o potencial socioeconômico da espécie.

Esta espécie pode ser identificada por características morfológicas, tais como: a rostró é alongado e curvado para cima. Possui uma pequena espinha localizada no quinto segmento abdominal. Na estrutura do télson, há uma ponta pontiaguda como um cone, contendo dois espinhos muito curtos na borda posterior que não ultrapassam sua ponta, os machos geralmente são maiores que as fêmeas, alcançando 15 centímetros e as fêmeas de 5 a 10 centímetros (Figura 02) (MELO,

2003).

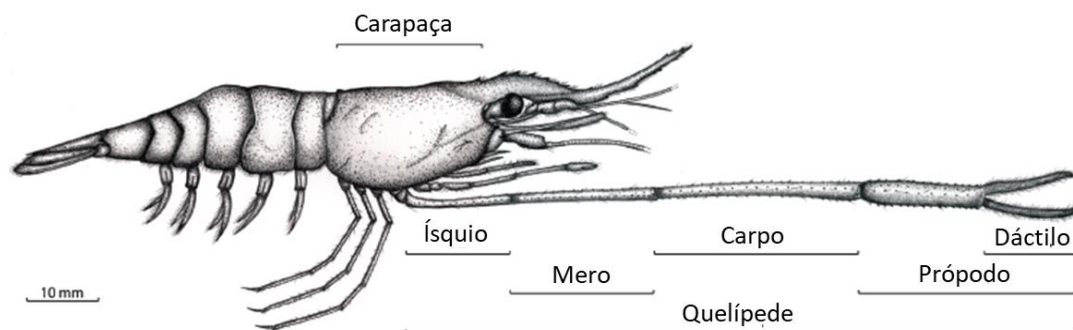


Figura 02: Um espécime de *M. amazonicum* apresenta propriedades morfolologicamente reconhecíveis da espécie. Ilustração adaptada de PANTALEÃO et al., 2014.

O conhecimento da biologia desses camarões é uma ferramenta fundamental para o desenho de estratégias de manejo, pois possibilita um melhor aproveitamento desse recurso natural, evitando a sobrepesca e, assim, reduzindo a produtividade. Além do *M. amazonicum*, o popularmente conhecido como pitú (*Macrobrachium carcinus*) também possui grande valor tanto comercial devido seu grande porte e bons índices de fecundidades e fertilidade em cativeiro, (LIMA et. al 2014).

O *M. amazonicum* é uma espécie de água doce que possui grande importância econômica na América do Sul. É também de grande importância econômica para o subcontinente americano ocidental e é fortemente explorado pela pesca manual no norte e nordeste do Brasil, além de ser consumido por populações indígenas e pessoas de todas as classes sociais, principalmente paraenses e Amapaenses (MACIEL; VALENTI 2009).

1.1 Estresse durante o cultivo

Atualmente, muitos aspectos do manejo larval são conhecidos, como por exemplo: alimentação, cor do tanque de cultivo, salinidade adequada, temperatura e comportamento trófico. (MACIEL e VALENTI, 2009; MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010; MACIEL e VALENTI, 2014; SOEIRO et al., 2016). No estágio de berçário foi estabelecido uma dieta alimentar e verificado que a espécie apresenta crescimento compensatório (ARAÚJO e VALENTI, 2005; MARQUES et al., 2012). Para o estágio final de crescimento, verificou-se que os camarões aceitam bem o adensamento, alcançando alta sobrevivência, com reduzida produção de resíduos. (MORAES-VALENTI e VALENTI, 2010). Estas características conferem a esta espécie uma

robustez que permite uma produção sustentável. Outro aspecto que vem sendo levado em consideração na carcinicultura é a crescente preocupação com o bem-estar animal (PATTERSON et al., 2007).

No processo de criação, os camarões passam por diferentes processos, incluindo procedimento de pesca e despescas, biometria, coleta de hemolinfa, troca de tanque e flutuações nos parâmetros químicos e físicos da água. No Brasil o transporte de animais vivos é bastante comum, sendo as atividades mais frequentes: transporte de pós-larvas para fazendas de criação, juvenis e adultos para principalmente para formação de um plantel de reprodutores, isca viva para pesca ou comercialização, venda ao consumidor (GIROTTI et al., 2010; FOTERDAR; EVANS, 2011; JENSEN et al., 2012).

No caso desses manejos forem realizados de maneira inadequada, poderá gerar estresse, debilitando o sistema imune e de forma a agir como porta de entrada para doenças (MERCIER et al., 2009; WALKER e MOHAN., 2009; ZHOU et al., 2010; FERREIRA et al., 2011). Em crustáceos, as respostas ao estresse são classificadas como primárias, secundárias e terciárias. O efeito primário envolve um aumento na liberação do hormônio hiperglicêmico (HHc), levando a alterações secundárias, como aumento dos níveis de glicose e lactato na hemolinfa e mobilização dos estoques de glicogênio nos músculos e glândulas digestivas. A terciária reflete diretamente na diminuição da eficácia do sistema imune do animal, tornando-o mais suscetível a eventuais infecções e dessa forma afetando o seu crescimento, ganho de peso e sobrevivência (HUBERMAN, 2000; LORENZON et al. 2005; APARICIO-SIMÓN et al., 2010; WILCOCKSON et al., 2002).

A resposta à dor e às substâncias potencialmente nocivas não é tão claramente definida como nos humanos. A capacidade de reconhecer estímulos potencialmente nocivos é um fator de sobrevivência evolutiva que está presente em todos os grupos de animais, mas apresenta padrões de respostas diversas entre as diferentes espécies (BROOM, 2001; RUTHERFORD, 2002; ELWOOD et al., 2015). Quando os camarões expostos a situações desagradáveis, eles demonstram um comportamento de “retirada-e-fuga”, de forma a aprender a evitar potenciais eventos traumáticos (SNEDDON, 2015; MAGEE e ELWOOD, 2013). Nesses animais a avaliação do potencial de “sentir dor” é principalmente através do seu comportamento, de modo

que eles apresentam várias características motoras de proteção (BATESON, 1991, SHERWIN, 2001; ELWOOD et al., 2011; GENTLE, 2011).

1.2 Anestésicos

Para garantir práticas de manejo bem-sucedidas sem estressar os animais, alguns fatores como temperatura da água, espécie, tamanho, densidade de estocagem, tempo de trânsito e precauções devem ser levados em consideração, e a duração do jejum ou a adição de anestésicos (LORENZON et al., 2007, PARODI et al., 2012; SOUZA et al., 2013, JENSEN et al., 2014).

A sedação é definida por uma diminuição da sensibilidade, resultando em um estado de calma no animal. Por outro lado, a anestesia inclui imobilização, perda de consciência e alívio da dor (ZHAL et al., 2012). Assim, o efeito sedativo correlaciona-se com o tipo de anestésico aplicado, a duração da exposição anestésica, bem como a fisiologia do animal (PARODI et al., 2012). De acordo com TSANTILAS et al. (2006), para um anestésico ser considerado eficaz, deve ser de fácil aplicação, altamente eficaz e seguro, não causando danos ao aplicador ou aos animais em contato.

A anestesia do camarão não resulta em imobilidade completa por causa das pleópodes e antenas, devido a movimento dos pleópodes está relacionado à entrada de água na câmara do ramal em direção ao escaphognatito. Neste caso, a perda completa da atividade do apêndice do exercício prejudica os processos respiratórios e osmorregulatórios (HENRY et al., 2012)

Dentre os anestésicos mais utilizados na piscicultura, na maioria sendo compostos sintéticos, temos o metanossulfonato de tricaina (MS-222), o metomidato, o 2-fenoxietanol, a benzocaína e a quinaldina (ZAHN et al., 2012). No entanto, os anestésicos podem causar danos, intensificando a liberação de catecolaminas e induzindo ao estresse, como por exemplo o uso da benzocaína e do MS – 222 que elevaram os níveis de cortisol em *Salmo salar* e *Hippoglossus hippoglossus*, respectivamente (ZHAL et al. 2010). Desse modo, primeiramente se deve determinar concentrações apropriadas para o estudo da espécie alvo e avaliar o potencial de novas substâncias anestésicas, como por exemplo, os óleos essenciais e seus compostos isolados (SILVA et al., 2013).

De acordo com COYLE (2005), para camarões, são definidos dois estágios de anestesia: o primeiro é a sedação, que refere-se à perda parcial de equilíbrio e

presença de resposta a estímulos externos; e o segundo à anestesia, caracteriza-se pela perda total do equilíbrio, ausência de resposta a estímulos externos, ou diferença dos parâmetros de qualidade da água.

1.3 Óleos essenciais como anestésicos

A utilização de óleos essenciais para uso como anestésico, demonstraram ser eficazes e ao mesmo tempo seguro em estudos sobre *Macrobrachium rosenbergii* (camarão-da-malásia) (SAYDMOHAMED & PAL, 2009), *Penaeus monodon* (camarão-tigre-gigante) (JIANG et al. al., 2020), *Litopenaeus vannamei* (camarão-de-patas-brancas) (PARODI et al., 2012) e *Palaemonetes sinensis* (LI et al., 2018). No entanto vale ressaltar que, de acordo com MATULOVIC FM e OSHIRO LMY (2015) em um trabalho com decápodes *Litopenaeus schmitti* (Camarão-caboclo) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (Camarão-rosa), o óleo de hortelã-pimenta causou o maior desconforto, impressão sugerida pelo movimento violento dos pereópodos quelados, próximos e ao redor das brânquias, como se tentassem retirar o irritante do local. A expansão da atividade direcionada especificamente pode ser interpretada como sugerindo dor, como esfregar ou focalizar a atenção em um ponto específico do corpo ou estrutura, bem como percepção da posição, localização da dor real ou lesão potencial (WEARY et al., 2006).

Óleos essenciais (OEs), são compostos que são formados pela mistura de substâncias voláteis com baixo peso molecular, os quais são provenientes de plantas aromáticas os quais são metabolitos secundários, podendo ser produzido em diferentes órgãos da planta (folhas, flores, caule e fruto), geralmente são obtidos por vapor ou hidro destilação (F. BAKKALI et al. 2008). Além disso, sendo produtos naturais, a aplicação de OEs pode ser mais ecológica e economicamente viável (REVERTER et al., 2014).

A utilização de OEs como anestésicos em peixes mostram que os mesmos são uma boa alternativa como anestésicos, como por exemplo: *Aloysia gratissima* (Erva-santa) (BENOVIT et al. 2015), *Aloysia triphylla* (Lúcia-lima) (GRESSLER et al. 2014) *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) (SILVA et al. 2012; RIBEIRO et al. 2016), e seus compostos isolados, (Menta) *Mentha spicata* (FAÇANHA e GOMES, 2005, SIMÕES e GOMES, 2009). Mesmo que ainda escassos os trabalhos de potenciais anestésicos provenientes de OEs, como por exemplo: OE de *Syzygium aromaticum* (COYLE et al. 2005, MATULOVIC et al. 2014), *Aloysia triphylla* e *Lippia alba* (PARODI

et al. 2012), principalmente trabalhos com decápodes. Os OEs demonstram ser seguros e eficientes em estudos sobre *Macrobrachium rosenbergii* (SAYDMOHAMED & PAL, 2009), *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012), *Penaeus monodon* (JIANG et al. al., 2020) e *Palaemonetes sinensis* (LI et al., 2018a).

1.4 *Syzygium aromaticum*

O Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma espécie arbórea, nativa das Ilhas Molucas, localizada no arquipélago da Insulíndia, Indonésia, tem um aroma forte, ardente e característico. Das sementes, há um aroma ativo, extrai-se o ácido eugênico, incolor e de sabor picante (Figura 03). Sua composição química inclui principalmente eugenol, acetato de eugenol, beta-cariofileno, ácido oleânico e substâncias das seguintes classes: triterpenos, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis.



Figura 03: Árvore de cravo (*Syzygium aromaticum*). Fonte: BERAUD / BSIP / SCIENCE PHOTO LIBRARY.

O eugenol (Figura 04) tem efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes, analgésicos e tem propriedades antissépticas. Seus efeitos medicinais incluem o tratamento de náuseas, flatulência, indigestão e desinteria. Dotado de propriedades antibacterianas, também é usado como anestésico e antisséptico para aliviar a dor de dente, seu OE, é um produto natural extraído, por destilação de caules, folhas e flores do cravo da Índia. Este possui vários pontos positivos como: como o baixo custo, baixa toxicidade para humanos e animais, foi bastante usado como anestésico local em odontologia, e

o próprio botão floral seco que é usado como tempero (NASCIMENTO et al., 2000; SOUZA et al., 2015; SILVESTRI, 2010).

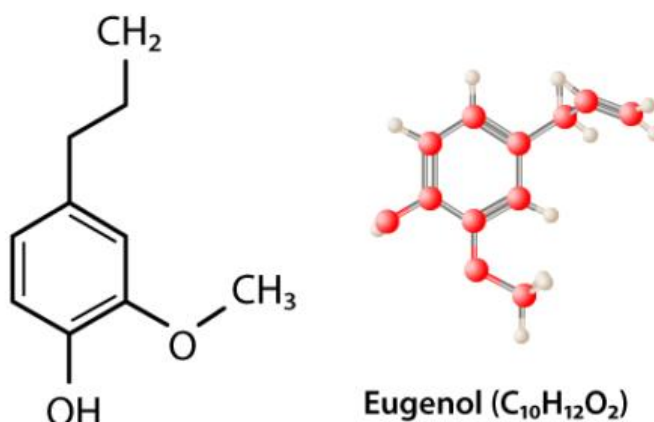


Figura 04: Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) - Estrutura, Massa Molecular, Propriedades e Usos. Disponível em: <https://byjus.com/chemistry/eugenol/>..

O eugenol é tipicamente absorvido pelas brânquias e inibe a transmissão de sinais neurais (canais de sódio, potássio e cálcio dNmetil-D-aspartato, receptores de ácido gama-aminobutírico tipo A) (Zahl et al., 2011). Dentro da aquicultura os OEs de *S. aromaticum* (eugenol) são bastante procurados para uso como anestésico (FERNANDES et al., 2017), tendo obtido resultados positivos em testes como anestésico em peixes e crustáceos, como por exemplo: *Homarus americanus* e *Carcinus maenas* (HUNTSBERGER, 2012); *Litopenaeus vannamei* (PARODI et al., 2012); (COYLE et al., 2005) e *Macrobrachium rosenbergii* (SAYDMOHAMMED; PAL, 2009), (tabela 1).



Figura 05: Eugenol adquirido para o uso durante o experimento. Disponível em: <https://www.utilidadesclinicas.com.br/eugenol-biodinamica-bio3619a.htm>

Tabela 1:A tabela mostra a eficiência de OEs de cravo (eugenol) como anestésicos em diferentes camarões.

Espécie	Anestésico	Dose	Efeito anestésico	Fonte
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man, 1879.	Eugenol	200 $\mu\text{L/L}^{-1}$	Anestesia leve	SAYDMOHAMMED & PAL, 2009.
<i>Penaeus vannamei</i> Boone, 1931.	Eugenol (99%)	200 $\mu\text{L/L}^{-1}$	Curto prazo	PARODI et al., 2012.
<i>Penaeus vannamei</i> Boone, 1931.	Eugenol (99%)	175 $\mu\text{L/L}^{-1}$	Curto prazo	PARODI et al., 2012.
<i>Penaeus semisulcatus</i> De Haan, 1844.	Eugenol -80%	100 mg/L^{-1} 150 mg/L^{-1}	Curto prazo	SOLTANI et al., 2004.
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man, 1879.	Óleo de cravo (95% eugenol).	5 gotas em 5 mL de etanol em 1000 mL de água.	-	TAYLOR et al., 2002
<i>Tenellum macrobrachium</i> Smith, 1871.	Óleo de cravo (82 - 87% eugenol).	300 $\mu\text{L/L}^{-1}$ 600 $\mu\text{L/L}^{-1}$ 900 $\mu\text{L/L}^{-1}$	10 - 26 24 - 30 18 - 50	ARÉCHIGA-PALOMERA et al., 2016.
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man, 1879.	Óleo de cravo (eugenol).	100 mg/L^{-1}	15 – 21	COYLE et al., 2005.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do uso do Eugenol como anestésicos para juvenis do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*)

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar uma dose de eugenol que seja segura e eficaz em induzir a sedação e anestesia em juvenis de *Macrobrachium amazonicum*;
- Determinar a capacidade de recuperação dos animais após a sedação e anestesia nas concentrações utilizadas;
- Verificar a sobrevivência dos animais após 24 horas de indução a pelo anestésico.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos animais

As fêmeas ovígeras foram capturadas no Estuário do Rio Caeté, na comunidade do Camutá (1°01'49.04" S, 46°45'14,26" W) (figura 6), localizado no município de Bragança-PA para obter as larvas e pós-larvas essas fêmeas foram coletadas com ovos translúcidos, indicativo da proximidade da eclosão das larvas. Após a coletas os animais foram submetidos à desinfecção em formaldeído a 3% por 30 minutos, seguido da transferência para tanques de eclosão.

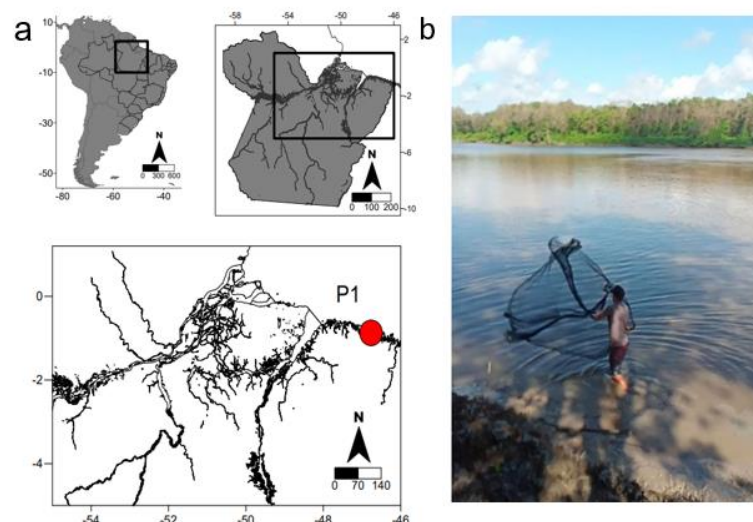


Figura 06: (a) Pontos de coleta das matrizes (gêmeas ovígeras) no Estuário do Rio Caeté, na comunidade do Camutá (P1), e (b) a forma que os animais foram capturados.

Os cultivos larvais foram desenvolvidos no Laboratório de Aquicultura do Campus de Bragança. A larvicultura foi realizada em tanques acoplados a filtros biológicos, em sistema fechado dinâmico, segundo protocolo proposto por MORAES-VALENTI e VALENTI (2010). Quando atingirem a fase de pós-larvas foram aclimatadas em água doce. Posteriormente, as PLs (pós-larvas) foram submetidas aos banhos anestésicos para determinar as doses adequadas para a anestesia.

O Eugenol foi adquirido em instituição comercial, sendo mantidos em refrigerador doméstico ($\sim 3,3^{\circ}\text{C}$) até a realização dos experimentos. As concentrações utilizadas foram estipuladas a partir dos dados disponíveis na literatura, utilizados em outras espécies de camarão. Dessa forma, testamos várias concentrações na tentativa de caracterizar aquela mais eficaz para adultos de *M. amazonicum*.

3.2 Indução a anestesia de curta duração em adultos de *M. amazonicum*

Inicialmente o Eugenol, proveniente do óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) deve ser diluído em Álcool Etílico Absoluto (99,8%) na proporção de 1:5 antes de ser adicionados aos aquários. Para os banhos com o anestésico foram utilizados o total de quatro concentrações para um litro de água cada, contendo dez réplicas biológicas para cada concentração ($n=40$), expostas individualmente as seguintes concentrações: $250\mu\text{L/L}$, $500\mu\text{L/L}$, $1000\mu\text{L/L}$ e $2000\mu\text{L/L}$. Os mesmos critérios são adotados para os dois grupos controles, contendo etanol (volume do tratamento de maior concentração $2000\mu\text{L/L}^{-1}$) e água, (sem adição de nenhum reagente). O tempo máximo de observação a indução aos banhos anestésicos foi fixado em 30 minutos, enquanto o tempo de recuperação terá duração máxima de 15 minutos. Os tempos de indução e recuperação são tomados por um cronômetro e todas as observações foram feitas por um observador capacitado (figura 7).

Os experimentos envolvendo a indução e recuperação da anestesia de curta duração foram conduzidos de acordo a metodologia descrita por COYLE et al. (2005), no qual os camarões são classificados em estágio I e estágio II, seguido da recuperação após ser retirado do banho anestésico. No estágio I corresponde aos animais que demonstram perda parcial do equilíbrio, mas ainda são reativos aos estímulos do toque; no estágio II apresentam perda completa do equilíbrio e não reagem aos estímulos.



Figura 07: Delineamento experimental das diferentes concentrações de eugenol testadas para verificação em juvenis de *M. amazonicum*.

A recuperação da anestesia é considerada quando os animais recuperarem o controle de seu equilíbrio e atingiram uma posição ereta no fundo dos aquários. Adicionalmente será observada mudança na coloração dos animais, pois foi observado em laboratório que os animais ficam esbranquiçados após manipulações demoradas (observação pessoal). Após a recuperação os animais serão transferidos para tanques de 1 litros contendo água com aeração, sem adição de nenhum produto. Os animais serão observados por 24 horas para verificar se ocorreu mortalidade tardia.

4. Resultados e Discussão

No presente estudo das quatro concentrações diluídas em álcool (1:5) foram utilizadas durante os testes anestésicos (250µL/L, 500µL/L, 1000µL/L e 2000µL/L) das quais a concentração de 500µL/L foi a que apresentou melhores resultados alcançando anestesia nos tempos médios de 10,44 minutos para o estágio I ou anestesia leve, 22,06 minutos para o estágio II ou anestesia profunda, com o tempo médio de recuperação de 11,50 minutos, havendo uma morte na segunda replica cerca de 40 minutos após o início do banho, morrendo ainda durante o período de recuperação de 15 minutos. Adicionalmente, foi verificado que a concentração de 2000µL/l de etanol (99,8%), não desencadeou nenhum estágio de anestesia nos

animais dentro do tempo estipulado, o mesmo foi feito para água demonstrando que todos os efeitos anestésicos alcançados foram atribuídos ao Eugenol.

Tabela 02: Médias dos tempos de indução e recuperação da anestesia (Média $\pm$ desvio padrão) do eugenol aplicado em banho anestésico para juvenis de *M. amazonicum*. NA corresponde a evento que não foi observado no durante o tempo de 15 min, Letras diferentes para cada linha foram utilizadas quando ocorreu diferença estatística entre as concentrações testadas.

Estágios anestésicos	Eugenol (μ l/L)				Valor de (p)	Valor de (F crítico)
	250	500	1000	2000		
I	12,59 $\pm$ 7,08 ^a	10,45 $\pm$ 4,33 ^b	1,48 $\pm$ 0,79 ^c	0,55 $\pm$ 0,42 ^d	P<0,05 (6,17061E-11)	2,892
II	1,53 $\pm$ 0,00 ^d	17,65 $\pm$ 3,23 ^a	6,74 $\pm$ 1,78 ^b	4,42 $\pm$ 2,64 ^c	P<0,05 (4,86891E-13)	2,991
Recuperação	3,95 $\pm$ 1,84 ^b	11,50 $\pm$ 3,75 ^a	NA ^c	NA ^c	P<0,05 (0,027189243)	4,066

Para o estágio I ou sedação leve, concentrações de 250 e 500µL/L se mostram pouco eficientes, necessitando de maiores tempos médios (12,59 e 10,44 minutos) respectivamente para indução. Em 30% das réplicas da concentração de 250µL/L não houve quaisquer efeitos anestésicos, diferente da concentração de 500µL/L, que alcançou 100% das réplicas. As concentrações de 1000 e 2000µL/L evidenciam os menores tempos médios de indução ao estágio I (1,47 e 0,55 minutos, respectivamente). Houve diferença significativa ($p < 0,05$ e $F = 2,892$) entre os tempos médios das duas concentrações (1000 e 2000µL/L), na qual 2000µL/L obteve o menor tempo de indução ao estágio I (Figura 08.A).

As concentrações de 250 e 500µL/L apresentaram indução ao estágio II, entretanto, apenas uma réplica da concentração de 250µL/L atingiu anestesia profunda em 15,3 minutos, não havendo efeito anestésico no restante. No entanto, na concentração de 500µL/L 80% das réplicas atingiram o estágio II com tempo médio de 17,65 minutos. Para as concentrações de 1000 e 2000µL/L, o tempo médios foi bastante reduzido (6,74 e 4,41 minutos, respectivamente), em comparação as concentrações anteriores todas as réplicas atingiram o estágio II de anestesia (figura 3.A).

Segundo BECKER et al., (2021) com uma concentração de 250µL/L, o eugenol induziu rapidamente a anestesia, mas causou $30,0 \pm 1,5\%$ de mortalidade em *Farfantepenaeus paulensis*, o que foi diferente dos resultados obtidos para *M. amazonicum*, dos quais 70% atingiram o estágio I no tempo médio de $12,59 \pm 7,08$, dos quais 90% não atingiram o estágio II, os quais apresentaram 100% de sobrevivência. Em concentrações mais altas (1000 e 2000µL/L), os animais atingiram, mais rápido a indução aos estágios I e II, e acordo com SOLTANI et al. (2004) animais expostos a altas concentrações de óleo de cravo (eugenol) necessitaram de tempos de recuperação mais longos, e assim como o presente estudo, muitas vezes acabam morrendo.

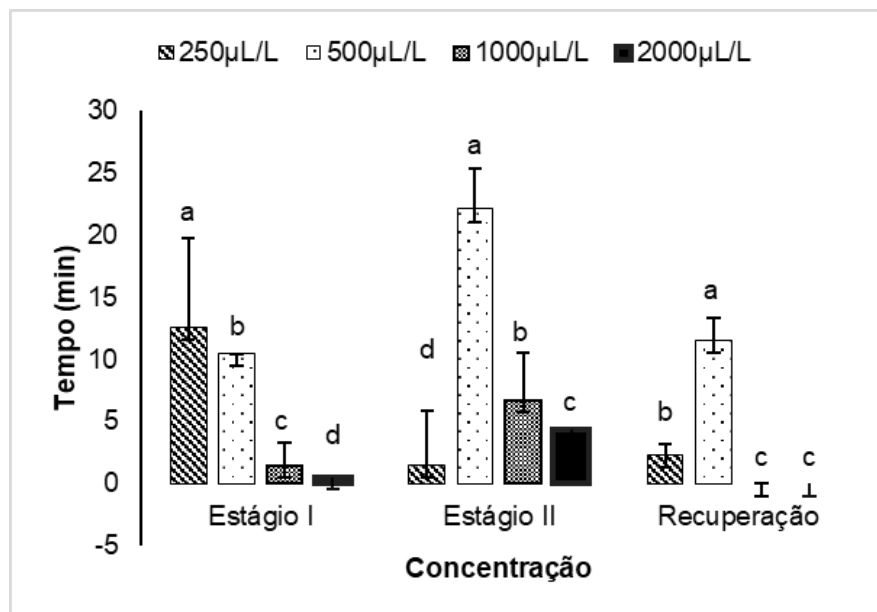
Segundo PARK et al., (2003) o óleo de cravo apresentou resultados de acordo com os critérios estabelecidos: induzindo ao estágio II em menos de 3 minutos e recuperando em até 10 min, com exceção da recuperação do camarão rosa (12.46 minutos), com o tempo de 15.3 minutos para a única replica induzida ao estágio II e tempo médio de 17.65 minutos para as concentrações 250 e 500µL/L, respectivamente e 6.74 e 4.42 minutos de tempo médio para 1000 e 2000µL/L para o

camarão-da-amazônia. Desse modo, notasse que concentrações altas de eugenol tendem a diminuir o tempo de indução ao estágio II, porém aumentar a concentração de óleo pode aumentar o risco de parada respiratória, provavelmente devido às suas propriedades físicas que abrangem a anatomia e o óleo associado à permanência nas brânquias, aumentando o efeito anestésico (SLADKY et al., 2001) e possivelmente levando a diminuição da troca respiratória.

De todas as quatro concentrações apenas as de 250 e 500µL/L apresentaram tempos de recuperação inferior a 15 minutos (tempo estipulado para recuperação), das quais 60 % nas duas concentrações recuperaram nesse intervalo de tempo, dos 40% restante na concentração de 250µL/L que não recuperaram dentro do tempo alvo, todos recuperaram no período de observação de 24 horas, não havendo morte nesta concentração, já nos 40% restante da concentração de 500µL/L com exceção de uma réplica que morreu em menos de 24 horas, obteve se sobrevivência de 90% das dos animais submetidos ao banho. Nas concentrações de 1000 e 2000µL/L não houve recuperação durante o tempo de 15 minutos (Figura 8.A).

Neste estudo, fica claro que as concentrações de 1000 e principalmente 2000µL/L com diluição de 1:5, são muito altas em termos de toxicidade, o desconforto do animal durante a exposição, de modo que os tempos de recuperação foram muito acima do esperado, e letal para 50% das réplicas a 1000µL/L e 70% a 2000µL/L. segundo estudos com adultos de *Macrobrachium rosenbergii* (SAYDMOHAMMED; PAL, 2009), a concentração crítica com melhores resultados de indução e recuperação foi 200µL/L, o pode se considerar um resultado aproximado visto que o presente trabalho foi realizado com juvenis de *Macrobrachium amazonicum*, que são mais tolerantes que adultos, necessitando de concentrações mais altas, como as utilizadas neste trabalho.

A



B

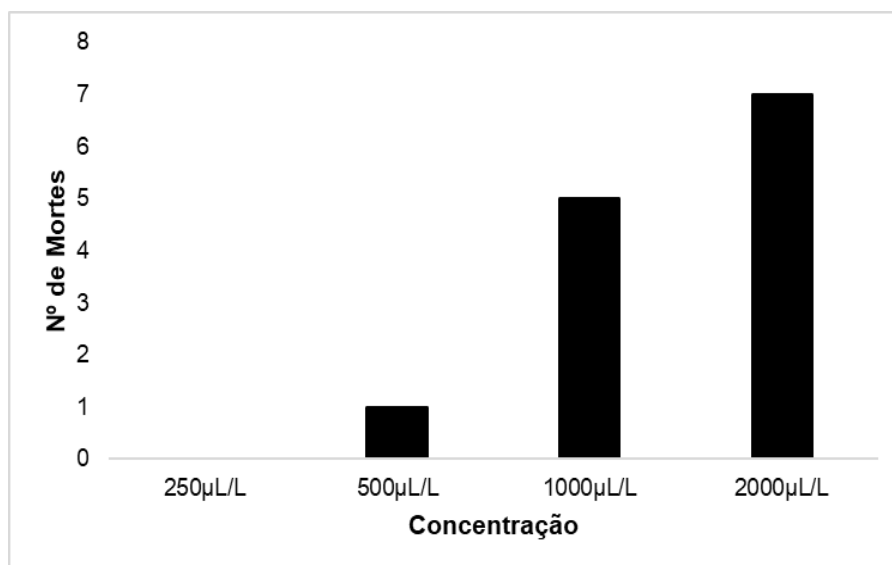


Figura 08: (A) efeito de exposição a diferentes concentrações de eugenol (250, 500, 1000 e 2000 µL/L) em juvenis de *M. amazonicum*, evidenciando o tempo necessário para alcance dos estágios de anestesia (I e II) e recuperação. Letras diferentes para cada linha foram utilizadas quando ocorreu diferença estatística entre as concentrações testadas (Kruskal-Wallis). As médias das colunas das diferentes concentrações com letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). (B) Mostra o registro do número de mortes para cada concentração usada durante os testes com Eugenol, as quais ocorreram com tempo inferior a 24 horas após o banho anestésico.

5. Conclusão

Em epílogo, todas as concentrações de eugenol utilizadas no presente estudo apresentaram algum efeito anestésico em juvenis de *Macrobrachium amazonicum*, tendo como dose crítica 500µL/L, apresentando melhores resultados sobrevivência, tempos de indução aos estágios I e II, e de recuperação em relação as demais concentrações testadas. Concentrações mais altas se mostram ineficientes, visto que apresentaram maiores tempos para recuperação e maiores índices de morte no período de 24 horas, como por exemplo nas concentrações de 1000 e 2000µL/L, que morreram 50 e 70%, respectivamente, das réplicas submetidas aos banhos.

6. Referências bibliográficas

- ARAUJO, M. C. e VALENTI, W. C. Manejo alimentar de pós-larvas do camarão da amazônia, *Macrobrachium amazonicum*, em berçário I. Acta Scientiarum Animal Sciences, v. 27, n. 1, p. 67–72, 2005.
- APARICIO-SIMÓN, B et al. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. Aquaculture, v. 298, n.3-4, p.308-314.2010.
- ATLI G e CANLI M (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 145:282-287.
- BATESON e P. Avaliação da dor em animais. Comportamento animal, v. 42, n. 5, p. 827-839. 1991.
- BECKER e ALESSANDRA JANAÍNA et al. Potencial anestésico de diferentes óleos essenciais para duas espécies de camarão, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Crustácea). O Cienc. Rural, Santa Maria, v. 51, n. 12, e20200793, 2021. Disponível em <http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782021001200652&lng=en&nrm=iso>. acesso em 16 de julho de 2022. Epub 19 de julho de 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200793>.
- BOCCHETTI R, FATTORINI D, PISANELLI B, MACCHIA S, OLIVIERO L, PILATO F, PELLEGRINI D e REGOLI F (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. Aquatic Toxicology 89:257-266.
- BOTHAM, P. A. Toxicidade sistêmica aguda - perspectivas para estratégias de testes escalonados. Toxicology in Vitro, v 18, p 227-230, 2004. 221-230, 200
- BRAY, W.A., LAWRENCE e A.L. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: Fast, A.W. and Lester, J.L. (Eds.), Marine Shrimp Culture: Principle and Practices. Elsevier Science Publisher B.V, p. 93-170. 1992.
- BROOM e D.M. 2001. Evolution of pain. *laams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 70:17-21.

COYLE e SD et al. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of the World Aquaculture Society, V. 36, n.3 p. 282-290 set. 2005.

CHANDRAN R, SIVAKUMAR AA, MOHANDASS S e ARUCHAMI M (2005) Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. Comparative Biochemistry and physiology Part C 140:422-426

ELWOOD, RW Dor e sofrimento em invertebrados? ILAR Journal, v. 52, n. 2, p. 175–184, 1 de janeiro. 2011.

FERNANDES e I.M et al. Eficácia do óleo de cravo como anestésico e procedimento de eutanásia em peixes tropicais de pequeno porte. Revista Brasileira de Biologia, v. 77, n. 3, p. 444–450, 26 conjuntos. 2016.

GENTLE e M. Pain in poultry. Applied Animal Behaviour Science, v.135, p. 252-258. 2011.

GIROTTTO e M.V.F. Efeitos da Amônia sobre Juvenis de *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD,1936) e de *Litopenaeus vannamei* (BOONE,1931): Excreção e Toxicidade. Curitiba. Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, p. 79. 2010.

GU J, LI Y, XIE L e ZHANG R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C.

HAYES, W. A.; DIPASQUALE e L.C. Acute toxicity and eye irritation. In: HAYES e A.W. Principles and Methods of Toxicology. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 200.

HENRY e R.P. et al. Múltiplas funções da brânquia crustácea: regulação osmótica/iônica, equilíbrio ácido-base, excreção de amônia e bioacumulação de metais tóxicos. Fronteiras em Fisiologia, v. 3, p. 431, 2012. Disponível em: < Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431> >. Acesso em: 22 de junho de 2020. doi: 10.3389/fphys.2012.00431.

HUBERMAN e A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191(1–3), 191–208.

JENSEN e L. et al. Efeito da densidade de estocagem no transporte do camarão-rosa *farfantepenaeus brasiliensis* (crustacea: decapoda), como isca viva para a pesca esportiva no Brasil. 2014.

JIANG e S. et al. Efeito anestésico do eugenol em diferentes concentrações e temperaturas sobre o camarão tigre branco (*Penaeus monodon*). Pesquisa em Aquicultura. 2020

LORENZON e S. et al. Efeito do estresse de diferentes temperaturas e exposição ao ar durante o transporte nos perfis fisiológicos da lagosta americana *Homarus americanus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 147, n. 1, p. 94–102, maio 2007.

LI, Y. et al. Influência da temperatura e tamanho na anestesia mentolada em camarão capim chinês *Palaemonetes sinensis* (Solaud, 1911). Pesquisa em Aquicultura, v. 49, n. 6, pág. 2091– 2098, 2018.

LIMA, J. de F., GARCIA, J. da S., e SILVA, T. C. da. (2014). Natural diet and feeding habits of a freshwater prawn (*Macrobrachium carcinus*: Crustacea, Decapoda) in the estuary of the Amazon River. *Acta Amazonica*, 44(2). <https://doi.org/10.1590/s0044-59672014000200009>

LAPA e J. A. et al Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C. M. O. SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. Farmacognosla: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. 1102p.

MACIEL, C. R., VALENTI e W. C. Biology, fisheries, and aquaculture of the Amazon River prawn *M. amazonicum*: a review. Nauplius, v. 17, n. 2, p. 61-79, 2009.

MARQUES, H. L. D. A. et al. Influence of stocking densities in the nursery phase on the growth of *Macrobrachium amazonicum* reared in net pens. Aquaculture, v. 358-359, p. 240-245, ago. 2012.

MAGEE, B.; ELWOOD, RW A evitação de choque por aprendizagem de discriminação no caranguejo da costa (*Carcinus maenas*) é consistente com um critério-chave para dor. Journal of Experimental Biology, v. 216, n. 3, p. 353–358, 1 fev. 2013.

MATELLI MATULOVIC, F.; MIYAKO YOSHII OSHIRO, L. Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Revista Acadêmica Ciência Animal, [S. l.], v. 14, p. 57–68, 2016. DOI: 10.7213/academica.14.2016.06. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/cienciaanimal/article/view/12500>. Acesso em: 20 abr. 2022.

MERCIER, L et al. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus*

vannamei (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, v. 40, n. 16, p. 1849-1863. 2009.

MORAES-RIODADES, PMC; VALENTI, WC Crescimento relativo do camarão canela *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) em viveiros. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 19, n. 4, p. 1181–1214, dez. 2002.

NASCIMENTO GGF, LOCATELLI J e FREITAS PC (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:247- 256.

NICHOLSON S e LAM PKS (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarker in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International* 31:121-132.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1987. OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OKAMOTO, M. H., TESSER, M. B., LOUZADA, L. R., SANTOS, R. A. DOS, e SAMPAIO, L. A. (2008). Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural*, 39(3), 866–870. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000100>.

PATTERSON, L.; DICK, JTA; ELWOOD, RW Respostas fisiológicas ao estresse em caranguejo comestível, *Cancer pagurus*, à prática pesqueira de desgrudar as garras. *Biologia Marinha*, v. 152, n. 2, p. 265-272, atrás. 2007.

PARODI, TV et al. A eficácia anestésica do eugenol e dos OEs de *Lippia alba* e *Aloysia triphylla* em pós-larvas e subadultos de *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 155, n. 3, p. 462–468, abr. 2012.

REVERTER, M. et al. Uso de extratos vegetais na aquicultura de peixes como alternativa à quimioterapia: situação atual e perspectivas futuras. *Aquacultura*, v. 433, p. 50-61, 2014. Disponível em: Acesso: 22 jun. 2020. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.048.

SAYDMOHAMMED, M.; PAL, AK Efeito anestésico de eugenol e mentol no manejo do estresse em *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquicultura*, v. 298, n. 1-2, pág. 162–167, 2009. Disponível em: Acesso: 22 de junho de 2020. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.10.020.

SILVESTRI, JDF et al. Perfil da composição e atividades antibacteriana e antioxidante do OE do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, v. 57, n. 5, p. 589–594, fora. 2010.

SNEDDON, NW. et al. Parâmetros genéticos para componentes do leite, incluindo lactose, dos registros do dia do teste no rebanho leiteiro da Nova Zelândia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 58, n. 2, p. 97-107. 2015.

SOUZA, RLM et al. Eugenol como anestésico no manejo de ariacó, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758), cultivado. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, n. 3, p. 532–538, 8 de maio de 2015.

SOUZA, DM et al. Efeitos da temperatura da água sobre parâmetros de estresse oxidativo no camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* durante o transporte. *Aquaculture*, v. 416-417, p. 310–314, dez. 2013.

SOUZA, C.F. et al. Óleos essenciais como agentes redutores de estresse para a aquicultura de peixes: A Review. *Fronteiras em Fisiologia*, v. 10, p. 785, 2019. Disponível em: < Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785> >. Acesso em: 22 de junho de 2020. doi: 10.3389/fphys.2019.00785.

Soltani M, Marmari GH, Mehrabi MR. Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. *Aquaculture International*. 2004; 12(4):457-466. doi:10.1023/B: AQUI.0000042137.26705.7b.

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

SHERWIN, C. M. Can invertebrates suffer? Or how robust is argument by analogy? *Animal Welfare*, 10:103-118. 2001.

TSANTILAS, H.; GALATOS, A.D.; ATHANASSOPOULOU, F.; PRASSINOS, N.N.; KOUSOULAKI, K. 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, p.64– 70, 2006.

VENTURA EC, GAELZER LR, ZANETTE J, MARQUES MRF e BAINY ACD (2002) Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research* 54:775-779.

VIDAL, L. V. O., ALBINATI, R. C. B., ALBINATI, A. C. L., LIRA, A. D. de, ALMEIDA, T. R. de, e SANTOS, G. B. (2008). Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8), 1069–1074. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800017>

WEARY, D. M., NIEL, L., FLOWER, F. C., e FRASER, D. (2006). Identifying and preventing pain in animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 100(1–2), 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.04.013>

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

Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM & Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* 34:151-162.

ZANETTE J, NUNES FF, MEDEIROS ID, SIEBERT MN, MATTOS JJ, LÜCHMANN KH, MELO CMR & BAINY ACD (2008) Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. *Marine Environmental Research* 66:196-198

7. Anexo

Tabela 3: valores individuais de cada concentração.

Concentração I: 250µL/L					Concentração I: 500µL/L			
Tempo (minutos)					Tempo (minutos)			
Replica	estágio I	estágio II	recuperação	morte	estágio I	estágio II	recuperação	morte
1º	4,22	15,3	NA	NA	15,12	NA	4,5	NA
2º	NA	NA	NA	NA	7,37	18,41	NA	†
3º	NA	NA	NA	NA	16,25	22	10,5	NA
4º	13,07	NA	5,37	NA	15,18	25,15	NA	NA
5º	20,11	NA	5,15	NA	6,17	20,04	12,4	NA
6º	25,3	NA	4,3	NA	6,06	28,14	NA	NA
7º	21,45	NA	2,05	NA	14,47	NA	12,56	NA
8º	20,55	NA	1,27	NA	6,22	19,22	NA	NA
9º	21,24	NA	5,54	NA	7,36	21,11	14,47	NA
10º	NA	NA	NA	NA	10,29	22,44	14,58	NA
Média	12,594	1,53	2,368		10,449	22,0638	11,5016667	

Concentração I: 1000µL/L					Concentração I: 2000µL/L			
Tempo (minutos)					Tempo (minutos)			
Replica	Estágio I	Estágio II	Recuperação	Morte	Estágio I	Estágio II	Recuperação	Morte
1º	0,32	5,3	NA	NA	1,24	9,1	NA	†
2º	1,47	11,4	NA	NA	1,17	6,58	NA	†
3º	2,06	7,33	NA	NA	0,23	3	NA	NA
4º	2,3	6,57	NA	NA	0,31	1,41	NA	†
5º	2,35	5,49	NA	NA	0,37	6,42	NA	NA
6º	1,01	6,4	NA	†	1,03	6,57	NA	†
7º	1,38	6,42	NA	†	0,2	4,46	NA	†
8º	0,23	5,32	NA	†	0,38	3,12	NA	†
9º	1,36	6,09	NA	†	0,24	2,1	NA	NA
10º	2,29	7,1	NA	†	0,37	1,39	NA	†
Média	1,477	6,742	NA		0,554	4,415	NA	