

Metabolismo respiratório e da glicose de *Carassius auratus* submetidos à concentrações de eugenol

Respiratory metabolism of "Carassius auratus" in different concentrations of eugenol

HONORATO, Claucia Aparecida^{1*}; NASCIMENTO, Camila Aparecida¹

¹Centro Universitário da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Agrárias, Curso de Medicina Veterinária, Dourados, Mato Grosso, Brasil.

*Endereço para correspondência: clauciahonorato@yahoo.com.br

RESUMO

Este trabalho tem como finalidade avaliar o uso do eugenol como anestésico para *Carassius auratus* mensurando o tempo de indução à anestesia em relação a diferentes concentrações e seus efeitos nas trocas gasosas respiratórias. Os peixes foram expostos as concentrações de 20, 40, 80, 120, 150mg L⁻¹ de eugenol. Os resultados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e cinco repetições cada um, submetidos à análise de variância e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$). Os valores de PaO₂ e PaCO₂ foram submetidos à regressão polinomial ($p > 0,05$). Foram avaliados o tempo de sedação e recuperação. O sangue foi retirado para análise parâmetros hematológicos, pH, pressão parcial de oxigênio (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato (HCO₃⁻) e glicose. As concentrações acima de 80 mg.L⁻¹ apresentaram sedação com 62 seg. A recuperação possui correlação inversa ao tempo de anestesia. O aumento das concentrações de eugenol proporcionou elevação de 27,5% nos hematócrito e de 37% no eritrócitos e houve aumento na glicose plasmática. Ademais, apresentaram diminuição na pressão de oxigênio no sangue (PaO₂), e aumento na pressão de dióxido de carbono (PaCO₂). A utilização do eugenol possibilitaria e melhoria o manejo nas pisciculturas sendo a dose recomendada de 40mg. L⁻¹ para *Carassius auratus* pois minimiza os riscos inerentes a processos anestésicos rotineiros, com menor comprometimento cardiovascular e, conseqüentemente, redução do risco de óbito.

Palavras-chave: anestesia, hemogasometria, manejo de peixes

SUMMARY

The study aimed to evaluate the use of eugenol as an anesthetic for *Carassius auratus* measuring time to anesthesia induction in different concentrations and their effects on gas exchange breathing. The fish were exposed to concentrations of 20, 40, 80, 120, 150 mg L⁻¹ of eugenol. The results were analyzed according to a completely randomized design with six treatments and five replications were submitted to analysis of variance and when significant, averages were compared by Student's test ($\alpha = 0,05$). the probability 5%. PaO₂ e PaCO₂ values were submitted to polynomial regression ($p > 0.05$). The sedation and recovery time it's the evaluation. Blood was withdrawn for hematological parameters analysis, pH, partial pressure of oxygen (PaO₂), partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂), bicarbonate (HCO₃⁻) and glucose. Concentrations above 80 mg.L⁻¹ presented sedation with 62 sec. The recovery has inverse correlation to time of anesthesia. Anesthetic induction of: *C. auratus* to different concentrations of eugenol provided 27.5 elevation on the values of percentage of hematocrit and erythrocyte number 37 and an increase in plasma glucose. *C. auratus* when subjected to the increased concentration of eugenol showed decrease in blood oxygen pressure (PaO₂), and increase in pressure of carbon dioxide (PaCO₂). The use of eugenol makes handling the fish farms, the recommended dose is 40 mg. L⁻¹ for *Carassius auratus* that minimize the risks inherent in routine anesthetic procedures, with less cardiovascular impairment and, therefore, reducing the risk of death.

Keywords: anesthesia, hemogasometry, fish management

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de peixes ornamentais com grande popularidade destaca-se *Carassius auratus* que ocupa lugar de destaque na comercialização mundial em função da sua aparência, docilidade durante o manejo e adaptação ao confinamento (TAGHIZADEH et al., 2013).

Os peixes ornamentais durante o cultivo, frequentemente precisam ser manejados para classificação e comercialização, o que envolve mudanças de ambiente e alteração na sua homeostasia. A utilização de substâncias anestésicas pode diminuir injúrias e morte durante as práticas de manejo (GHOLIPOURKANANI et al., 2013). Dentre os anestésicos com potencial para utilização na piscicultura destaca-se o eugenol. Esta substância é muito usada na odontologia (MAZZAFERA, 2003). O eugenol é recomendado como um anestésico com poucos riscos de intoxicação (INOUE et al., 2011) eficácia, seguridade e de baixo custo (PADUA et al., 2012).

A anestesia em peixes pode ser afetada por fatores biológicos tais como diferença entre espécies e tamanho e por fatores ambientais (ROTILI et al., 2012). Dentre os estágios de anestesia de peixe, observa-se nos primeiros estágios (I e II) a diminuição dos batimentos operculares e no estágio III aumento dos movimentos operculares (ROSS & ROSS, 2008). Como as brânquias dos peixes têm múltiplas finalidades, desde promover as trocas gasosas, regulação osmótica iônica e hematológica (GHOLIPOURKANANI et al., 2013), a diminuição nos movimentos operculares podem alterar estas funções. A utilização de anestésicos pode causar reações adversas secundárias tais como acidose e estresse osmótico devido à parada

respiratória e insuficiente troca gasosa e iônica entre o sangue e a água (Z AHL et al., 2012).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o uso do eugenol como anestésico para *Carassius auratus* mensurando o tempo de indução à anestesia em relação a diferentes doses e seus efeitos nas trocas gasosas respiratórias e no metabolismo energético.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares de *Carassius auratus* foram mantidos por um período de aclimação de 7 dias no laboratório. Estes foram acondicionados em um tanque de 100L de água termostatzada e aerada. Os peixes foram alimentados com ração comercial *ad libitum* (45% Proteína bruta, 3800kcal. Kg⁻¹ Energia digestível). A qualidade de água foi monitorada diariamente com o multiparâmetro: para aferição da temperatura (T°C), do potencial hidrogeniônico (pH) e do oxigênio dissolvido (O₂D).

Na indução anestésico foram separados 60 exemplares de *Carassius auratus* com peso de 10,53±1,04g divididos em 6 caixas de 20L de água termostatzada e aerada. Os peixes foram expostos a concentrações de 20, 40, 80, 120, 150mg L⁻¹ de eugenol (O eugenol por ser oleoso, foi diluído em álcool etílico (92,8°) no momento do uso, no que resultou em solução-estoque à concentração de 100mg mL⁻¹ (1:10)), e um controle (peixes submetidos ao manejo de troca de aquários sem utilização de anestésico). Submetidos individualmente ao banho anestésico, no qual foi monitorado o tempo para a indução anestésica e o tempo de recuperação. O tempo necessário para a latência total dos peixes foi considerado

como o início da exposição até a perda total de equilíbrio na coluna de água e a parada dos batimentos operculares, condição equivalente ao estágio III de anestesia (ROSS & ROSS, 2008). Após atingir o estágio III, retirou-se o sangue com seringa de 1mL heparinizada pela veia caudal e transferidos para um aquário com água sem anestésico, onde foi verificado o tempo de recuperação, considerado como o período necessário para que os peixes recuperassem o equilíbrio e a natação ativa na coluna de água.

Para a coleta de sangue cinco peixes de cada tratamento foram coletados aleatoriamente. O sangue foi analisado em aparelho de hemogasometria. Os parâmetros analisados foram pH, pressão parcial de oxigênio (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂) e bicarbonato (HCO₃⁻) e foi analisado a glicose (TRINDER, 1969). Os parâmetros hematimétricos, foram determinados o percentual do hematócrito, pelo método do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). A contagem de eritrócitos após diluição do sangue previamente homogeneizado em solução formol-citrato (1:200) e contagem realizada em hemocitômetro. Para determinação da concentração de hemoglobina, foi utilizado o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). Com estes foram calculados os índices hematimétricos (WINTROBE, 1934), compreendidos pelo Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Os resultados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e dez repetições para as análises de indução e recuperação anestésica e cinco repetições para as análises sanguíneas, submetidos à análise de variância e

quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Os valores de PaO₂ e PaCO₂ foram submetidos à regressão polinomial ($p > 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações testadas foram eficientes para induzir a imobilidade de *C. auratus* com diferentes tempos de indução anestésica (Figura 1a). Durante a indução anestésica, o comportamento dos peixes seguiu o seguinte padrão: hiperatividade ao primeiro contato com o anestésico, caracterizada pela natação agitada contra as paredes do aquário; natação lenta; diminuição dos batimentos operculares, parada do animal na posição dorso ventral, perda da reação aos estímulos externos; perda do tônus muscular. Em nenhuma das concentrações de eugenol testadas houve mortalidade.

O tempo para que o *C. auratus* apresentasse imobilidade foi inversamente proporcional ao aumento na dose de eugenol administrada. A concentração de 20mg.L⁻¹ obtiveram tempo de indução anestésica em torno de 202seg, considerado longo para atingir o plano anestésico. O tempo de indução anestésica de 77±18seg foi obtida pela concentração de 40mg.L⁻¹. Alevinos de *Pseudoplatystoma corruscans* apresentam tempos de indução inferiores a um minuto com concentrações de 50, 75 e 100mg.L⁻¹ de eugenol (VIDAL et al., 2008). A concentração adequada de eugenol para indução e recuperação anestésica em jundiás (*Rhamdia voulezi*) é de 50mg.L⁻¹ (DIEMER et al., 2012). O óleo de cravo possui efeito anestésico para alevinos de lambari, sendo 50mg.L⁻¹ a concentração eficiente e segura para indução à anestesia profunda em até 1,5

minuto, ressaltando a maior resistência devido a diferença de peso em comparação as demais espécies (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009). *Carassius auratus* com 2,7g, não

apresenta sedação com doses de eugenol inferiores a $37,5\text{mg.L}^{-1}$ e a dose de 75mg L^{-1} acarretou em morte de 25% dos peixes (BITTENCOURT et al., 2012).

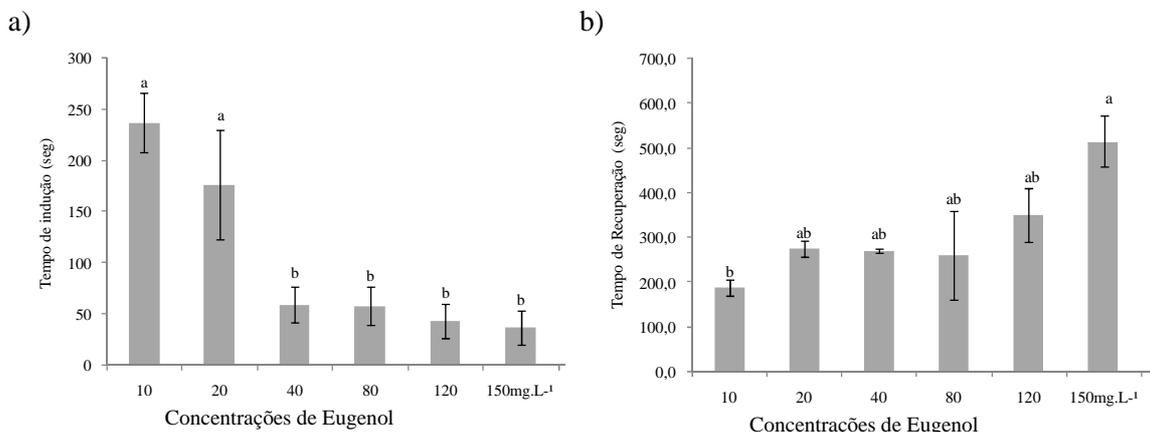


Figura 1. Tempo de indução (a) e recuperação (b) de *Carassius auratus* submetidos a diferentes concentrações de eugenol

O aumento na dose de eugenol proporcionou aumento ($P>0,05$) no tempo de recuperação a anestesia para *C. auratus* (Figura 1b). A dose de 150mg.L^{-1} de eugenol proporcionou anestesia rápida dos peixes ($60,0\pm 10,6\text{seg}$), no entanto, o tempo de recuperação foi de $740\pm 57,4\text{seg}$. O tempo de recuperação recomendado para o *Epinephelus bruneus* a indução à anestesia profunda deve ser inferior a 600seg (PARK et al., 2008). A indução à anestesia profunda deve levar de 1 a 3min e a recuperação não deve ultrapassar 5min (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009). Ao expor pampo *Trachinotus marginatus*, à concentração de 25ppm eugenol os peixes levaram 10min para atingir a latência total, e na concentração de 75ppm apenas 2min, sendo inversamente proporcional ao tempo de recuperação (OKAMOTO et al., 2009). Em um estudo com *C. auratus*, o tratamento com dose de 75mg.L^{-1} proporcionou tempo de recuperação acima de 15 minutos,

inadequado para o bem estar dos peixes (BITTENCOURT et al., 2012).

A indução anestésica de *C. auratus* à diferentes concentrações de eugenol proporcionou elevação ($P>0,05$) de 27,5% nos valores de percentual de hematócrito e de 37% no número de eritrócitos (Tabela 1). A anestesia com óleo de cravo em tucunara (*Gymnotus inaequilabiatus*) ocasiona alterações no hemograma, dose-dependente (PADUA et al., 2012). Para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) o uso de óleo de cravo promoveu aumento na quantidade de eritrócito (PADUA et al., 2013). Apesar do aumento na quantidade de eritrócito em *C. auratus* estas caracterizam-se como normocíticas-normocrômicas, resultante da ação de catecolaminas (liberadas pela ativação do eixo hipotálamo – sistema nervoso simpático – células cromafins), que determinam a contração esplênica em resposta ao estímulo de estresse agudo (INOUE et al., 2004). Estes corroboram

com a elevação dos níveis de glicose plasmática em resposta ao banho anestésico com eugenol em relação ao grupo controle (Tabela 1). A glicose é um dos indicadores mais utilizados na avaliação do estresse em peixes como resposta secundária, sua elevação deve-se a presença de algum fator estressante para suprir a maior demanda energética, característica de situações desfavoráveis

(DINIZ & HONORATO, 2012). O uso de anestésico pode ter efeitos secundários indesejados que reduzem o bem-estar dos peixes, como a acidose (ZAHL et al., 2012). Neste estudo não observou-se o quadro de acidose metabólica uma vez que os valores de pH e bicarbonato plasmático sofreram alterações em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros sanguíneos de *C. auratus* submetidos a diferentes concentrações de eugenol

Parâmetros	Controle	Concentração de eugenol (g.L ⁻¹)				
		20	40	80	120	150
Eritrograma						
Eritrocito (x10 ⁶ µL ⁻¹)	2,9±0,5 ^b	3,2±0,5 ^{ab}	3,7±0,4 ^b	3,6±0,6 ^a	3,5±0,5 ^a	3,7±0,4 ^a
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	12±1,5	13,6±1,6	11,5±1,4	17,4±2,1	13,6±1,6	11±1,3
Hematócrito (%)	36±3,7 ^b	39,3±4,0 ^{ab}	38,8±3,4 ^b	49,5±5,0 ^a	40,4±4,1 ^a	41±3,2 ^a
VCM (f.L)	123,3±24,3	123,6±24,3	126,1±24,8	138,7±27,3	115,1±22,7	116,5±23,0
HCM (pg)	41,1±6,0	42,8±6,2	42,8±6,2	48,7±7,1	38,7±5,7	41,4±6,0
CHCM (g.dL ⁻¹)	33,3±4,7	34,6±4,9	33,9±4,8	35,2±5,0	33,7±4,8	35,5±5,0
Controle ácido-base						
pH	7,3±0,6 ^a	7,2±0,6 ^a	6,8±0,6 ^{ab}	6,8±0,6 ^{ab}	6,7±0,6 ^b	6,7±0,6 ^b
Bicarbonato	4,6±0,2 ^c	5,9±0,2 ^b	5,9±0,3 ^a	5,1±0,2 ^a	4,9±0,2 ^{ab}	4,6±0,2 ^a
Metabólito secundário						
Glicose (g.dL ⁻¹)	99±9,7 ^b	263±19,7 ^a	246±19,5 ^a	242±18,2 ^a	254±17,9 ^a	257±18,8 ^a

VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; CV = coeficiente de variação.

Valores com letras distintas reportam diferença significativa pelo teste de Tuckey (P>0,05).

O estudo da variável bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) permite avaliar a resposta do organismo frente a variações do pH no sangue. O bicarbonato é responsável por mais de 50% da capacidade tampão extracelular (LUNA, 2002). Neste estudo observou-se aumento na concentração de bicarbonato plasmático até a concentração de 40mg.L⁻¹. Estes estão diretamente relacionados a elevação na PaCO₂ pois o mecanismo compensatório eleva as taxas de bicarbonato a fim de neutralizar o excesso de CO₂ presente no sangue. Nas

concentrações acima de 80mg.L⁻¹ observou-se manutenção nos níveis de bicarbonato que podem ser atribuídas ao aumento dos batimentos operculares comuns no primeiros estágios anestésicos destas concentrações de *C. auratus* quando submetidos ao aumento de concentração de eugenol como indutor anestésico apresentaram uma sutil diminuição na PaO₂, e leve aumento na PaCO₂ (Figura 2).

A diminuição do pH com concomitante aumento de bicarbonato (Tabela 1), revela que o peixe submetido a maiores concentrações de eugenol apresentou

quadro de acidose respiratória. O aumento de CO_2 desencadeia a reação de formação de ácido carbônico (H_2CO_3), que posteriormente pela ação da anidrase carbônica aumenta a produção de bicarbonato (HCO_3^-), que

atua como tampão fisiológico. Estes resultados permite estabelecer o quadro de acidose respiratória caracterizada pela diminuição do pH, decréscimo nos teores de HCO_3^- e aumento da PaCO_2 .

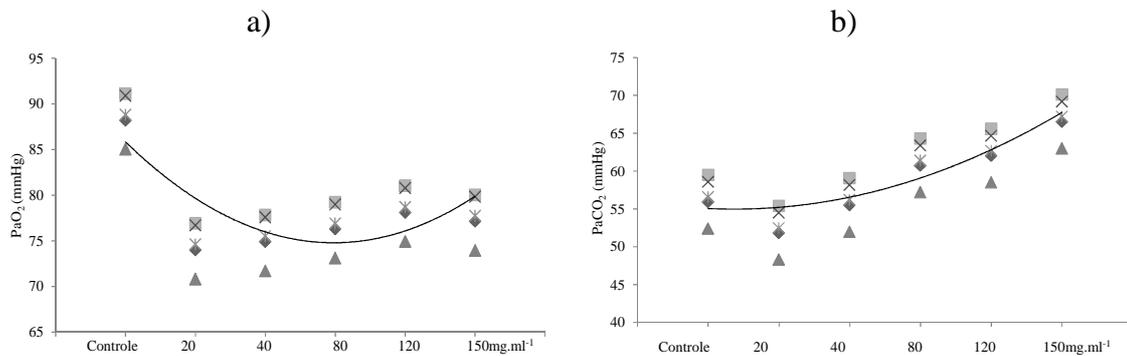


Figura 2. (a) Pressão parcial de oxigênio (PO_2) e (b) dióxido de carbono (PCO_2) de *C. auratus* submetidos a diferentes concentrações de eugenol

A utilização de anestésicos pode causar reações adversas secundárias tais como acidose e estresse osmótico devido à parada respiratória e insuficiente troca gasosa e iônica entre o sangue e a água (Z AHL et al., 2012). As variações PaO_2 e PaCO_2 podem ser compensadas por compensações cardíacas (KEEN et al., 2012). Os peixes apresentarem hiperventilação quando estão no estágio III de anestesia, com o intuito de aumentar as trocas gasosas. No entanto, para o *C. auratus* aumento dos batimentos operculares não foi suficiente para aumentar a atividade cardio-respiratória resultando em baixas trocas gasosas.

A difusão das trocas gasosas nas brânquias dos teleósteos é mais dificultada pela excreção de CO_2 do que pela captação de O_2 (LIMA BOIJINK et al., 2010). Mecanismo de hiperventilação são respostas ao decréscimo na concentração de oxigênio no sangue (hipoxemia) induzida pela acidose

(KEEN et al., 2012) em contrapartida a elevação na concentração de CO_2 no sangue é capaz de desencadear respostas cardiorrespiratórias (PORTEUS et al., 2012). No entanto, o aumento na pressão de CO_2 arterial, e concomitante diminuição do pH, são inevitáveis durante a hipercardia, mecanismo este utilizado para alterar o gradiente de difusão entre o sangue e água diminuindo a PCO_2 (MILSON, 2012).

A utilização do eugenol possibilita o manejo nas pisciculturas, a dose recomendada é de 40mg. L^{-1} para *Carassius auratus* sem comprometimento das funções cardiorrespiratórias

AGRADECIMENTOS

A Dra. Fernanda P. L. Zauith Diretora do Hospital Veterinário da UNIGRAN. O estudo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biossegurança e ética. Processo CEUA- 104/11.

REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1597-1602, 2012.
- COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, n.6, p.550-552, 1944.
- DIEMER, O.; NEU, D.H.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Eugenol como anestésico para jundiá (*Rhamdiavoulezzi*) em diferentes pesos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.4, p.1495-1500, 2012.
- DINIZ, N.M.; HONORATO, C.A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo - revisão. **Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia UNIPAR**, v.15, n.2, p.149-154, 2012.
- GHOLIPOURKANANI, H.; AHADIZADEH, S. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. **Springer Plus**, v.76, n.2, p.1-5, 2013.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.
- INOUE, L.A.K.A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Assessment of 2-phenoxyethanol and benzocaine as anesthetics for field procedures in matrinxá (*Bryconcephalus*). **Biodiversidade Pampeana**, v.2, n.1, p.10-15, 2004.
- INOUE, L.A.K.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, P.T.; SILVA, A.M.D.; AFFONSO, E.G. Avaliação de respostas metabólicas do tabaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazonica**, v.41, n.2, p.327-332, 2011.
- KEEN, A.N.; GAMPERL, A.K. Blood oxygenation and cardio respiratory function in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged with an acute temperature increase and zatebradine-induced bradycardia. **Journal of Thermal Biology**, v.37, n.3, p.201-210, 2012.
- LIMA BOIJINK, C.; FLORINDO, L.H.; LEITE, C.A.C.; KALININ, A.L.; MILSON, W.K.; RANTIN, F.T. Hypercarbic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): the role of branchial CO₂ chemoreceptors. **Journal of Experimental Biology**, v.213, p.2797-2807, 2010.
- LUNA, S.P.L. Equilíbrio ácido-básico. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Rocca, 2002. p.120-129.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.2, p.231-238, 2003.
- MILSON, W.K. New insights into gill chemoreception: receptor distribution and roles in water and air breathing fish. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.184, n.3, p.326-339, 2012.

OKAMOTO, M.H.; TESSER, M.B.; LOUZADA, L.R.; SANTOS, R.A.; SAMPAIO, L.A. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.866-877, 2009.

PÁDUA, S.B.; DIAS NETO, J.; SAKABE, R.; CLAUDIANO, G. da S.; CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F. Notas Científicas Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p.1171-1174, 2013.

PADUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M.; HISANO, H.; ROTTA, M.A.; ARANTES, F.C. Respostas hematológicas em tucunaré após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, n.3, p.181-188, 2012.

PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.T.; SEOL, D.W.; LEE, J.; PARK, I.S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v.39, p.877-884, 2008.

PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R.; COPPOLA, M.P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1851-1856, 2009.

PORTEUS, C.S.; BRINK, D.L.; MILSOM, W.K. Neurotransmitter profiles in fish gills: Putative gill oxygen receptors. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.184, n.3, p.316-325, 2012.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell, 2008. 222p.

ROTILI, D.A.; DEVENS, M.A.; DIEMER, O.; LORENZ, E.K.; LAZZARI, R.; BOSCOLO, W.R. Uso de eugenol como anestésico em pacu. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.3, p.288-294, 2012.

TAGHIZADEH, V.; IMANPOOR, M.; HOSSEINZADEH, M.; AZARIN, H. Effects of acidic water in combination with aluminum on swimming behavior and survival of yolk-sac larval in Goldfish (*Carassius auratus gibelio*). **SpringerPlus**, v.2, n.1, p.1-6, 2013.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Analytical Clinical Biochemistry**, v.6, p.24-27, 1969.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

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

Data de recebimento: 25/03/2015

Data de aprovação: 20/07/2016