



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AQUICULTURA

Utilização de benzocaína, eugenol e tricafina metanosulfato (MS-222) como anestésicos em juvenis e adultos para a sardinha verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira

Ricardo Shunji Takeuchi

FLORIANÓPOLIS
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Takeuchi, Ricardo Shunji Takeuchi

Utilização de benzocaína, eugenol e tricafina metanosulfato (MS-222) como anestésicos em juvenis e adultos para a sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879) [dissertação] / Ricardo Shunji Takeuchi Takeuchi ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira Cerqueira - Florianópolis, SC, 2012.

36 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. isca-viva. 3. manejo de peixes. 4. Clupeidae. 5. *Katsuwonus pelamis*. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani Cerqueira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Utilização de benzocaína, eugenol e tricafina metanosulfato (MS-222) como anestésicos em juvenis e adultos para a sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879).

Por

RICARDO SHUNJI TAKEUCHI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira – *Orientador*

Dra. Anita Rademaker Valença

Dr. Bernardo Baldisserotto

Dr. Evoy Zaniboni Filho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, irmãos, e a Gabriela, que de forma especial e carinhosa me deram força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Ao meu orientador Vinícius, pelo apoio, compreensão e amizade.

Aos meus queridos amigos e colegas de Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Cristina, Gabriel, Herdras, Guto, Fábio, Virgínia, Claudia, Luiz, Scheila, Felipe, João, Marcela, Beatriz, Lucas, Andressa, Wanessa, Israel, Vaico e Salete.

A Capes pela concessão da bolsa de mestrado e pelo fomento ao projeto Isca-viva.

Aos parceiros do projeto isca-viva LAPAD, Cepsul/IBAMA e Univali.

Aos profissionais do CEDAP/ EPAGRI pela ajuda no transporte dos peixes.

Aos técnicos, José Luiz, Felipe, e Carlos dos Laboratórios de Microbiologia e Qualidade de água.

RESUMO

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, tem grande importância para a indústria de pescado e também para a pesca de atum, na modalidade vara e isca, servindo como isca viva. Na aquicultura, os anestésicos são utilizados diariamente para facilitar manejo e reduzir o estresse. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos e a eficácia de três agentes anestésicos em juvenis e adultos e determinar a concentração mínima necessária para a anestesia. Juvenis, com de peso $4,96 \pm 0,89$ g e comprimento de $8,2 \pm 0,5$ cm, e adultos, com peso de $30,02 \pm 5$ g e comprimento de $15,7 \pm 1$ cm, foram expostos individualmente a quatro concentrações de cada anestésico benzocaína (25, 37,5, 50, 67,5 mg.l⁻¹), MS-222 (50, 75, 100, 125 mg.l⁻¹) e eugenol (20, 40, 60, 80 mg.l⁻¹). Para cada concentração testada foram utilizados 10 peixes (n=10). Como premissas básicas, considerou-se que o tempo de anestesia deveria ser menor do que 3 minutos e a recuperação menor que 10 minutos. As concentrações ideais obtidas para temperatura de 25°C foram 40 mg.l⁻¹ de eugenol, 100 mg.l⁻¹ de MS-222 para ambos os tamanhos, e a de benzocaína foi de 35 mg.l⁻¹ para os juvenis e de 50 mg.l⁻¹ para os adultos. Para o eugenol e a benzocaína os tempos de indução e recuperação foram proporcionais ao tamanho.

Palavras chaves: isca-viva, manejo, Clupeidae, *Katsuwonus pelamis*, tamanho.

ABSTRACT

The Brazilian sardine, *Sardinella brasilliensis*, is very important for canned fillet's Company and also used as live bait for skipjack tuna's fishing, *Katsuwonus pelamis*. Anesthetics are routinely used in aquaculture to ease handling and reduce stress. The objective of this study was to evaluate the efficacy of three anesthetics in two size classes of Brazilian sardine and establish minimum concentration for anesthesia. Juvenile (weight 4.96 ± 0.89 g and size 8.2 ± 0.5 cm) and adult (weight 30.02 ± 5 g and size 15.7 ± 1 cm) were individually exposed to four different concentrations of clove oil (20, 40, 60, 80 mg.l⁻¹), MS-222 (50, 75, 100, 125 mg.l⁻¹) and benzocaine (25, 37.5, 50, 67.5 mg.l⁻¹). For each dose were utilized ten fish (n=10). Anesthetics should induce anesthesia in less than 3 min and recovery in 10 min. The optimal dose at 25°C were determined to be 40 mg.l⁻¹ clove oil and 100 mg.l⁻¹ MS-222 for both size classes and 35 mg.l⁻¹ benzocaine for juvenile and 50 mg.l⁻¹ de benzocaína for adult. Increasing fish size fish needed more time to induce and to recover from clove oil and MS-222.

Keywords: live bait, handling, Clupeidae, *Katsuwonus pelamis*, size.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estágios de Indução e recuperação (IWANA et al., 1989). 26
- Tabela 2.** Tempos de indução (segundos) dos juvenis e adultos de *Sardinella brasiliensis* anestesiadas com eugenol, MS-222 e benzocaína e sua mortalidade após a exposição..... 27
- Tabela 3.** Tempos de recuperação (segundos) dos juvenis e adultos de *Sardinella brasiliensis* anestesiadas com eugenol, MS-222 e benzocaína 28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Histórico	15
1.2. Biologia de espécie.....	15
1.3. Isca-viva	16
1.4. Anestésicos na piscicultura	16
2. OBJETIVO	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. ARTIGO	22
RESUMO	22
ASBTRACT.....	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Nas regiões sul e sudeste a sardinha verdadeira *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879) foi considerada na década de 90 o maior recurso pesqueiro do Brasil, sustentando um importante setor produtivo da pesca nestas regiões, envolvendo diversas frotas com base nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (IBAMA, 2005).

A pesca da sardinha-verdadeira no Brasil teve início em escala industrial no final dos anos 1960 e se desenvolveu rapidamente até 1973, quando atingiu um montante recorde de 223 mil toneladas anuais. Na década de 1980, sua captura baixou para um patamar de 100-155 mil toneladas e em 2000 atingiu o menor valor da história desta pescaria, em torno de 17 mil toneladas anuais (IBAMA, 2005).

Estudos anteriores ao ano 2000, já mostravam que os estoques de sardinha apresentavam sinais de colapso, devido a fatores climáticos e também pela captura de reprodutores durante o período de maturação (VALENTI; CARDOSO, 1991; ROSSI-WONGTSCHOWSKI et al., 1996).

1.2. Biologia de espécie

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, é um peixe pelágico de águas subtropicais, comprimento máximo de 290 mm, encontrado ao longo da plataforma continental (até 100 m de profundidade) entre o Cabo de Santo Tomé, no Rio de Janeiro (22° S) e um pouco ao sul do Cabo de Santa Marta, em Santa Catarina (28° S) (SACCARDO et al., 1988).

O seu corpo é alongado com pigmentação escassa durante o estágio larval, comum entre os clupeídeos, a característica principal do grupo é a posição do ânus que se situa na parte posterior do corpo, com a distância pré-anal de 80 % do comprimento padrão (MATSUURA, 1977).

A conceituação do estágio de larva para *S. brasiliensis*, abrange exemplares planctônicos entre 3,5 e 19,0 mm de comprimento padrão, a partir do tamanho de 19,0 mm ocorre uma considerável mudança nas proporções corporais sendo, portanto, considerado como o fim do estágio larval e início do estágio pré-juvenil, que se estende até 30,0 mm (MATSUURA, 1977).

De acordo com VAZZOLER (1962), a sardinha-verdadeira atinge a maturidade gonadal (L₅₀) com comprimento total entre 160 e 170 mm,

com aproximadamente um ano e meio de vida, estando todos os indivíduos da população maduros com 210-220 mm (L_{100}). A longevidade é de pouco mais de três anos de idade (ISAAC-NAHUM et al., 1988).

1.3. Isca-viva

Na pesca do atum, *Katsuwonus pelamis*, é utilizada isca-viva. Diversas espécies de peixes são utilizadas nesse tipo de pesca, entretanto o juvenil da sardinha verdadeira é a isca preferida dos barcos atuneiros, representando em média 78,4% do total de iscas utilizadas em 1994, 1995 e 1997 (IBAMA, 2007).

A isca-viva é capturada através de cerco, sendo transferida para embarcação e colocada em tinas com fluxo de água do mar constante. A isca é mantida viva durante a busca dos cardumes de atum para então serem lançadas ao mar. Não há estimativas precisas sobre a mortalidade das iscas, mas sabe-se que o estresse da captura, manipulação incorreta a bordo, densidade e alimentação inadequadas, contaminação das tinas, alterações bruscas da temperatura e salinidade da água circulante, são os principais fatores que contribuem para a elevada perda, cujos índices alcançam 50%, podendo chegar a 100% (IBAMA, 2006). Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento técnicas de manejo que melhorem a sobrevivência dos juvenis de sardinha.

A pesca de juvenis e adultos da sardinha-verdadeira ameaça os estoques naturais e limita o sistema de pesca com vara e isca-viva do atum. Isso também ameaça um método de pesca que é considerado sustentável pelos ambientalistas, pois é seletivo a uma única espécie capturando somente os atuns maiores, ao contrário de outros métodos (cerco e espinhel) que acabam capturando outras espécies (CERQUEIRA et al. 2011).

1.4. Anestésicos na piscicultura

Estudos com anestésicos são indispensáveis para diminuir a mortalidade nos barcos atuneiros e para diminuir o estresse de manejo. Diariamente em laboratórios de piscicultura os peixes são submetidos constantemente ao estresse como, por exemplo, biometrias, seleção, marcação, aplicação de vacinas ou hormônios, transporte, coleta de sangue, biopsia de gônadas e coleta de gametas.

Os efeitos do estresse podem ser divididos em três respostas: A resposta primária, é caracterizada pela liberação dos hormônios corticosteroides (cortisol) e da concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), o início das respostas secundárias é

observado pelo aumento dos níveis de cortisol, glicose e lactato no sangue. A resposta terciária é descrita pela diminuição da resistência dos peixes às doenças, pois ocorre uma diminuição no número de leucócitos, diminuição do número de linfócitos e aumento do número de neutrófilos circulantes (MAZEAUD et al., 1977).

Outras consequências do estresse os quais podemos citar são o rompimento dos processos reprodutivos (STRANGE et al., 1977), a diminuição do crescimento e da eficiência alimentar. Esses fatores afetam diretamente os custos de produção de um laboratório de reprodução ou uma fazenda de engorda.

A utilização de certos tipos e concentrações de anestésicos garante que o eixo hipófise-pituitária-interrenal não seja ativado durante o estresse causado pelo manejo. O mecanismo de prevenção não é bem conhecido. Porém é razoável assumir-se que os sinais sejam completamente ou parcialmente bloqueados, evitando o desencadeamento dos efeitos do estresse (OLSEN et al., 1995).

Estudos com diversas espécies de peixes relatam a redução do estresse com a utilização de anestésicos. Iversen et al. (2003) relataram que concentrações maiores ou iguais a: 2 mg.l⁻¹ de metomidato, 20 mg.l⁻¹ de eugenol e isoeugenol são necessárias para reduzir estresse no salmão do atlântico (*Salmo salar*). Wagner et al. (2003) concluíram que 60 mg.l⁻¹ de eugenol reduzem o estresse em truta (*Oncorhynchus mykiss*). Heo e Shin (2010), utilizaram 100 mg.l⁻¹ de benzocaina para reduzir o estresse em carpa (*Carassius carassius*).

Dentre as características para a escolha do anestésico deve se considerar a eficácia, o custo, a disponibilidade no mercado, a segurança durante o uso e os possíveis efeitos colaterais aos peixes, humanos e ao meio ambiente (MARKING; MEYER, 1985).

Nos peixes os anestésicos são administrados através de imersão em soluções anestésicas, por meio das brânquias que absorvem e eliminam os agentes anestésicos. As propriedades físico-químicas dos agentes anestésicos somados aos fatores respiratórios, quantidade de sangue passando pelas brânquias, influenciam a taxa de absorção e com isso afetam o tempo de indução e recuperação da anestesia (Z AHL et al., 2009).

Muitos produtos químicos são utilizados para a anestesia de peixes. Os mais comuns são a tricafna metanosulfato (MS-222), a quinaldina, 2-fenoxietanol, benzocafna e o eugenol (VELISEK et al., 2011). Sendo que o único anestésico aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), do governo dos Estados Unidos, é o MS-222.

Ainda segundo a FDA os animais que são tratados com esse químico só podem ser consumidos 21 dias após a exposição ao produto.

O MS-222 é um isômero da benzocaína com um radical sulfônico, aumentando a solubilidade em água, podendo ser utilizado diretamente na água sem a necessidade de preparo de solução. A adição do radical sulfônico também faz com que o MS-222 reduza o pH da água (CHO; HEATH, 2000).

A tricafina metanosulfato é o anestésico mais utilizado no mundo, a sua utilização já foi estabelecida para muitas espécies (ROSS; ROSS, 1999). No entanto, o custo do MS-222 é alto no Brasil e dificilmente é encontrado no mercado (GOMES et al., 2001). Por isso, a importância de se encontrar novas fontes de anestésicos de baixo custo e seguros aos peixes e ao manipulador.

Outro anestésico muito utilizado na aquicultura é o eugenol, que além de anestésico, possui propriedades bactericidas (KEENE et al. 1998). Retirado da planta *Eugenia aromatica* o eugenol é diluído em álcool para então ser dissolvido na água.

O eugenol tem alta disponibilidade no mercado, baixo custo e é considerado seguro para o meio ambiente e ao manipulador (IVERSEN et al., 2003). Diversos estudos utilizaram o eugenol como anestésico. Roubach et al. (2005) anestesiaram tambaquis (*Colossoma macropomum*) com 65 mg.l⁻¹ e Mylonas et al. (2005) definiram 40 mg.l⁻¹ como concentração ideal para anestésico robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) o pargo europeu (*Sparus aurata*). Okamoto et al. (2008) recomendaram 50 mg.l⁻¹ para pampo (*Trachinotus marginatus*).

No Brasil, o anestésico mais utilizado é a benzocaína, pois possui um baixo custo, disponibilidade no mercado, tempo de indução e recuperação rápidos e boa margem de segurança para os peixes e para o manipulador (GOMES et al., 2001).

A benzocaína (éster etílico do ácido paraaminobenzóico) é um anestésico local utilizado em mamíferos, e nos peixes por meio de imersão em água. Possui baixa solubilidade em água, podendo ser diluída em etanol ou acetona para ser utilizada como anestésico. Para a indução anestésica em peixes a benzocaína tem sido utilizada na concentração de 25-100 mg.l⁻¹, dependendo do nível de anestesia desejada. As propriedades farmacocinéticas da benzocaína aumentam com a elevação da temperatura da água (MEINERTZ, 1999).

De acordo com Zahl e colaboradores (2009) a eficácia de um agente anestésico é influenciada por fatores como a espécie, idade, tamanho, sexo, dosagem e também fatores ambientais tais como salinidade, pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água.

O peso e o tamanho dos peixes estão ligados ao metabolismo e aos processos fisiológicos, tendo uma relação inversa entre peso-tamanho e a taxa de metabolismo basal (Z AHL et al., 2011). Se os peixes apresentam um metabolismo basal acelerado, maior quantidade de sangue passará pelas brânquias e mais rápido serão absorção e eliminação dos anestésicos.

No entanto, a relação entre peso-tamanho e absorção e eliminação dos anestésicos em peixe é mais complexa. (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004; TSANTILAS et al. 2006, Z AHL et al. 2009 e 2011). Fatores como composição corporal, maturidade sexual e a relação entre área de superfície da brânquia e peso corporal podem explicar essa variação (Z AHL et al., 2011).

Fatores como tamanho e peso não apresentam uma relação clara com o tempo de indução. Hoskonen e Pirhonen (2004), estudando o “whitefish” *Coregonus lavaretus* observaram que o tempo de indução diminuiu em peixes maiores anestesiados com eugenol e encontraram uma relação inversa com a truta (*Oncorhynchus mykiss*), já no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e na truta marrom (*Salmo trutta*) não apresentaram diferença no tempo de indução.

Tsantilas e colaboradores (2006) encontraram uma relação positiva entre o tamanho e os tempos de indução do sargo (*Diplodus sargus*) e do sargo bicudo (*Diplodus puntazzo*). No tempo de recuperação encontraram uma relação inversa com o tamanho com o *D. sargus* e não encontraram uma tendência coerente com o *D. puntazzo*.

Pereira (2010), em um estudo descritivo de captura, manejo e maturação em cativeiro utilizou a concentração de 30 mg.L⁻¹ de benzocáína no transporte da sardinha verdadeira. No entanto, não foram encontrados estudos na bibliografia de anestesia com a *Sardinella brasiliensis*.

Este trabalho está na forma de um artigo científico, redigido nas normas da revista Ciência Rural.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Determinar a eficácia da benzocaína, MS-222 e do eugenol como anestésicos para juvenis e adultos de *Sardinella brasiliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração ideal de eugenol, MS-222, e benzocaína para a sardinha verdadeira em duas classes de tamanho;
- Avaliar o efeito do tamanho nos tempos de indução e recuperação;

3. ARTIGO:

Benzocaína, eugenol e tricaina metanosulfato (MS-222) como anestésicos em juvenis e adultos de sardinha verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879)

Benzocaine, eugenol and tricaine methanesulfonate (MS-222) as a anesthetic for juvenile and adulto of brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879)

Ricardo Shunji Takeuchi¹ Luiz Augusto Reis da Silva¹ Cristina
Carvalho¹ Gabriel Passini¹ Fábio Sterzelecki¹ Vinícios Ronzani
Cerqueira¹

RESUMO

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, tem grande importância para a indústria de pescado e também para a pesca de atum, na modalidade vara e isca, servindo como isca viva. Na aquicultura, os anestésicos são utilizados diariamente para facilitar manejo e reduzir o estresse. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos e a eficácia de três agentes anestésicos em juvenis e adultos e determinar a concentração mínima necessária para a anestesia. Juvenis, com de peso $4,96 \pm 0,89$ g e comprimento de $8,2 \pm 0,5$ cm, e adultos, com peso de $30,02 \pm 5$ g e comprimento de $15,7 \pm 1$ cm, foram expostos individualmente a quatro concentrações de cada anestésico benzocaína (25, 37,5, 50, 67,5 mg.l⁻¹), MS-222 (50, 75, 100, 125 mg.l⁻¹) e eugenol (20, 40, 60, 80 mg.l⁻¹). Para cada concentração testada foram utilizados 10 peixes (n=10). Como premissas básicas, considerou-se que o tempo de anestesia deveria ser menor do que 3 minutos e a recuperação menor que 10 minutos. As concentrações ideais obtidas para temperatura de 25°C foram 40 mg.l⁻¹ de eugenol, 100 mg.l⁻¹ de MS-222 para ambos os tamanhos, e a de benzocaína foi de 35 mg.l⁻¹ para os juvenis e de 50 mg.l⁻¹ para os adultos. Para o eugenol e a benzocaína os tempos de indução e recuperação foram proporcionais ao tamanho.

Palavras chaves: isca-viva, manejo, Clupeidae, *Katsuwonus pelamis*, tamanho.

ABSTRACT

The Brazilian sardine, *Sardinella brasilliensis*, is very important for canned fillet's Company and also used as live bait for skipjack tuna's fishing, *Katsuwonus pelamis*. Anesthetics are routinely used in aquaculture to ease handling and reduce stress. The objective of this study was to evaluate the efficacy of three anesthetics in two size classes of Brazilian sardine and establish minimum concentration for anesthesia. Juvenile (weight 4.96 ± 0.89 g and size 8.2 ± 0.5 cm) and adult (weight 30.02 ± 5 g and size 15.7 ± 1 cm) were individually exposed to four different concentrations of clove oil (20, 40, 60, 80 mg.l⁻¹), MS-222 (50, 75, 100, 125 mg.l⁻¹) and benzocaine (25, 37.5, 50, 67.5 mg.l⁻¹). For each dose were utilized ten fish (n=10). Anesthetics should induce anesthesia in less than 3 min and recovery in 10 min. The optimal dose at 25°C were determined to be 40 mg.l⁻¹ clove oil and 100 mg.l⁻¹ MS-222 for both size classes and 35 mg.l⁻¹ benzocaine for juvenile and 50 mg.l⁻¹ de benzocaína for adult. Increasing fish size fish needed more time to induce and to recover from clove oil and MS-222.

Keywords: live bait, handling, Clupeidae, *Katsuwonus pelamis*, size.

INTRODUÇÃO

A sardinha verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879) foi considerada o maior recurso pesqueiro dos anos 90 (IBAMA, 2005), e tem grande importância para a pesca do atum (*Katsuwonus pelamis*) servindo como isca viva, na qual são capturadas 800 toneladas por ano de juvenis de sardinha verdadeira (5 cm), sendo que a mortalidade nos barcos varia em torno de 50% (IBAMA, 2006). Devido a isso, tornam-se necessários estudos com o manejo, reprodução e de produção da sardinha verdadeira (CERQUEIRA et al., 2011).

Atualmente, o único anestésico aprovado nos Estados Unidos pela “Food and Drug Administration” (FDA) é o MS-222, altamente solúvel em água, o que faz dele uma ótima opção para anestesia de peixes (ORTUÑO et al., 2002). O MS-222 é um dos anestésico mais conhecidos e utilizados no mundo, mas o uso contínuo desse anestésico pode causar danos a quem o manuseia (ROUBACH et al., 2001).

GOMES et al. (2001) consideram a benzocaína um dos anestésicos mais utilizados no Brasil e que possui um baixo custo, disponibilidade no mercado, tempo de indução e recuperação rápidos e boa margem de segurança para os peixes e para o manipulador. Outro anestésico bastante utilizado é o eugenol, que tem características antibactericidas, antivirais, analgésicas e é considerado seguro para quem o manuseia, para os animais e o ambiente (ROUBACH et al., 2005).

A eficácia de um agente anestésico depende da espécie, idade, peso, tamanho, sexo, dosagem e também por fatores ambientais como: salinidade, pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água (Z AHL, 2009). Fatores como tamanho e peso não apresentam uma relação clara com o tempo de anestesia e recuperação. HOSKONEN & PIRHONEN (2004) estudando o “whitefish” *Coregonus lavaretus* observaram que o tempo de indução diminuiu em peixes maiores anestesiados com eugenol e encontraram uma relação inversa com a truta (*Oncorhynchus mykiss*). No salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e na truta marrom (*Salmo trutta*) os mesmos autores não encontraram diferença no tempo de indução. Ainda observaram que os tempos de recuperação não tiveram influência com o tamanho.

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos e a eficácia de benzocaína, MS-222 e eugenol em juvenis e adultos de sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, e determinar a concentração mínima necessária para a anestesia.

MATERIAL E MÉTODOS

Aclimação e obtenção dos animais

Os exemplares de sardinha verdadeira, juvenis ($4,96 \pm 0,89$ g e $8,2 \pm 0,5$ cm) e adultos ($30,02 \pm 5$ g e $15,7 \pm 1$ cm), foram capturados na praia do Pântano do Sul e na praia da Barra da lagoa, litoral de Santa Catarina. Antes de cada experimento os peixes foram aclimatados em tanques de 2000 l a temperatura média de 25°C , com fluxo contínuo (1300 l.h^{-1}), alimentados com ração comercial (50% de proteína bruta, INVE®) até a saciedade aparente 4 vezes ao dia, durante duas semanas. Diariamente o tanque era sifonado para retirada dos detritos depositados no fundo.

Preparo das soluções anestésicas

O preparo da solução estoque de eugenol (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA) foi feito com a diluição em álcool de 1:10, a benzocaína (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA) foi diluída em álcool na diluição 1:9, e o MS-222 (Western Chemical) foi diluído diretamente na água salgada (35‰).

Desenho experimental

Para avaliar a eficácia do anestésico foi utilizada a tabela de estágios de indução e recuperação (Tabela 1), de IWAMA et al. (1989). Para cada concentração anestésica testada foram utilizados 10 peixes ($n=10$), retirados aleatoriamente dos tanques de 2000 l e imersos separadamente um peixe por aquário contendo 10 l de água salgada misturada com as respectivas concentrações de anestésico com aeração constante, por meio de pedra porosa, a temperatura foi mantida em 25°C . O tempo foi registrado por meio de cronômetro digital. Cada peixe foi utilizado uma única vez.

Neste estudo foram testadas quatro concentrações de três agentes anestésicos em juvenis e adultos de sardinha verdadeira: Benzocaína (25; 37,5; 50; e $67,5 \text{ mg.l}^{-1}$), MS-222 (50; 75; 100; 125 mg. L^{-1}) e eugenol (20; 40; 60; 80 mg. L^{-1}).

Tabela 1. Estágios de Indução e recuperação (IWAMA et al., 1989).

Estágios de indução	
I	Perda parcial do equilíbrio, peixe com natação errática.
II	Perda total do equilíbrio e do músculo, movimentos operculares lentos e sem resposta ao toque
III	Movimentos operculares imperceptíveis e perda total dos reflexos
Estágios de Recuperação	
I	Ausência de equilíbrio, sem movimentos do corpo, movimentos operculares leves
II	Recuperação do equilíbrio e dos movimentos operculares
III	Similar à pré-anestesia

Após atingir o estágio de indução III, os peixes foram pesados e medidos com balança de precisão (0,01g) e com paquímetro (0,01 cm). Para então serem transferidos para os aquários de recuperação com 10l de água do mar livres de anestésicos e com aeração, para determinação do tempo de recuperação, caracterizado pelo retorno do comportamento similar a pré-anestesia, estágio de recuperação III. Foram considerados não induzidos a anestesia os peixes que não atingissem o estágio de indução III após 10 minutos de imersão nos agentes anestésicos. Após os testes de anestesia e recuperação, os animais ficaram em observação durante 24h em um tanque contendo 300l de água para a avaliação da sobrevivência.

A água dos aquários foi totalmente trocada a cada teste. Os testes foram realizados sempre da menor para a maior concentração, e os aquários foram lavados com água do mar antes de se avaliar uma nova concentração.

Análise Estatística

Os dados de tempo de indução e recuperação de mesma classe de tamanho foram submetidos à análise de variância (ANOVA “one-way”) e para avaliar diferença nos tempos de indução e recuperação entre as diferentes classes de tamanho foi utilizada a análise de variância fatorial (“factorial” ANOVA). Quando constatadas diferenças nas médias foi aplicado teste de Duncan (software Statistica 7.0) para determinar a significância das diferenças. Foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi registrada nenhuma mortalidade no período de aclimação. Após 48h do experimento também não houve mortalidade. Nas duas classes de tamanho a sardinha verdadeira atingiu o estágio III de indução com todos os agentes anestésicos testados. Os dados de tempo de indução e recuperação estão expressos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Valores médios do tempo de indução (segundos) dos juvenis e adultos de *Sardinella brasiliensis* anestesiadas com eugenol, MS-222 e benzocaína e sua mortalidade após a exposição.

Anestésico	Concentração mg.L ⁻¹	Indução (s)		Mortalidade (%)	
		5 g	30 g	5 g	30g
Eugenol	20	410,8 ± 64,9 a	-	0	0
	30	239,2 ± 57,9 bA	332,5 ± 38,5 aB	0	0
	40	117,2 ± 22,2 cA	187,6 ± 42,72 bB	0	0
	50	94,2 ± 27,5 dA	104,7 ± 13,84 cA	0	0
MS-222	50	-	-	0	0
	75	224,7 ± 62,4 aA	320,8 ± 111,6 aB	0	0
	100	127,7 ± 34,3 bA	172,6 ± 53,1 bB	0	0
	125	80,2 ± 26,7 cA	110 ± 14,5 cB	0	0
Benzocaína	25	-	-	0	0
	37,5	180,5 ± 40,4 aA	328,7 ± 81,3 aB	0	0
	50	130,7 ± 28,9 bA	113,7 ± 28,5 bA	0	0
	67,5	106,2 ± 39,7 bA	80,8 ± 13,5 cA	0	0

Dados de tempo de indução e recuperação estão com desvio padrão ao lado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre a mesma coluna, em um mesmo anestésico; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05) entre a mesma linha, na indução ou recuperação.

Tabela 3. Valores médios tempos de recuperação (segundos) dos juvenis e adultos de *Sardinella brasiliensis* anestesiadas com eugenol, MS-222 e benzocaína

Anestésico	Concentração mg.L ⁻¹	Recuperação (s)	
		Indução (s)	Recuperação (s)
Eugenol	20	300,5 ± 93,7 a	-
	30	225,8 ± 69,8 bA	465,2 ± 79,2aB
	40	169,9 ± 20,7 cA	417,1 ± 89,9aB
	50	241,6 ± 83,2 bA	368,1 ± 89,5aB
MS-222	50	-	-
	75	134,7 ± 61,2 aA	201,7 ± 117,3 aA
	100	123,1 ± 46,38 aA	288 ± 54,3 abB
	125	165,7 ± 48,5 aA	272 ± 33,5 bB
Benzocaína	25	-	-
	37,5	212,6 ± 94,1 aA	320,3 ± 81,0 aB
	50	209,4 ± 65,4 aA	226,1 ± 68,2 aA
	67,5	197,7 ± 58,1 aA	299,7 ± 168,6 aA

Dados de tempo de indução e recuperação estão com desvio padrão ao lado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre a mesma coluna, em um mesmo anestésico; Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre a mesma linha, na indução ou recuperação.

O critério para determinar eficiência de um agente anestésico foi anestesiar em um tempo menor ou igual a 3 minutos e recuperar em menos de 10 minutos (MYLONAS et al., 2005), sem causar mortalidades e com um custo benefício razoável.

As menores concentrações ideais necessárias para anestesia foram 100 mg.l⁻¹ de MS-222 e 40 mg.l⁻¹ de eugenol em juvenis e adultos, e para a benzocaína a menor concentração ideal foi de 37,5 mg.l⁻¹ de benzocaína para juvenis, e nos adultos foram necessários 50 mg.l⁻¹ de benzocaína. OKAMOTO et al. (2008) relataram resultados semelhantes com o pampo, *Trachinotus marginatus*, cujas as concentrações ideais de benzocaína e eugenol foram 50 mg.l⁻¹. O que é um resultado esperado, pois ambas as espécies são peixes pelágicos marinhos da região sul/sudeste do Brasil.

Juvenis de sardinha demonstraram ser mais sensíveis aos anestésicos principalmente com a benzocaína observando mortalidade moderada a leve nas concentrações maiores, até 40% na concentração de 67,5 mg.l⁻¹ benzocaína, de 20% na concentração de 50 mg.l⁻¹ de benzocaína e 10 % na concentrações 50 mg.l⁻¹ de eugenol, provavelmente por overdose anestésica.

Enquanto que nos testes com adultos de sardinha não houve mortalidade destacando a importância de estudos de anestesia com diferentes tamanhos. TSANTILAS (2006) também encontrou mortalidades de até 70% utilizando altas concentrações de anestésicos, 0,4 ml.l⁻¹ de 2-fenoxietanol em *Diplodus sargus* e *Diplodus puntazzo*. Neste experimento também foi observada a mortalidade de 10% na concentração de 75 mg.l⁻¹ de MS-222, mas provavelmente foi erro de manejo.

Analisando os tempo de indução de juvenis anestesiados com eugenol e MS-222, pode-se observar uma relação positiva entre o tempo de indução e o tamanho. Esse resultado também foi verificado em estudos de TSANTILAS et al. (2006) anestesiando *Diplodus sargus* com 2-fenoxietanol, HOSKONEN & PIRHONEN (2004) com a *Oncorhynchus mykiss* anestesiando com o eugenol, ZAHL et al. (2009) estudando o *Gadus morhua* com benzocaína e MS-222 e ZAHL et al. (2011) com *Hippoglossus hippoglossus* anestesiado com a benzocaína, MS-222, quinaldina e isoeugenol.

Os tempos de recuperação do eugenol e do MS-222 também foram maiores nas sardinhas maiores. O aumento do tempo de indução e recuperação nos peixes maiores indica uma lenta taxa absorção dos agentes anestésicos pelas brânquias. A taxa absorção dos agentes anestésicos depende da área de superfície das brânquias em relação ao peso corporal (OIKAWA & ITAZAWA, 1985). Sugerindo que os adultos tem uma menor área de superfície das brânquias em relação ao tamanho. Além disso, os juvenis tem um metabolismo mais acelerado que os adultos. Esse metabolismo acelerado exige um maior consumo de oxigênio, aumentando a quantidade de sangue passando pelas brânquias, resultando em uma maior taxa de absorção de anestésicos (CLARKE & JOHNSTON, 1999).

Outros autores relataram diferentes resultados da relação do tamanho com tempo de recuperação. WOOD et al. (2002) e HOSKONEN & PIRHONEN (2004) não encontraram relação do tamanho do peixe com o tempo de recuperação. TSANTILAS et al. (2006) e ZAHL et al. (2011) observaram uma redução do tempo de recuperação em peixes maiores. Estes resultados da relação entre o

tamanho e tempo recuperação dos peixes podem estar ligados a diferentes fatores, tais como: espécie, peso corporal, idade e maturidade sexual que influenciam na fisiologia do peixe (Z AHL 2011), portanto, influenciam diretamente na resposta aos agentes anestésicos.

CONCLUSÃO

As concentrações ideais para a *Sardinella brasiliensis* de 5 e 30 g foram 40 mg.l⁻¹ de eugenol, 100 mg.l⁻¹ de MS-222 e 37,5 mg.l⁻¹ de benzocaína para os juvenis e 50 mg.l⁻¹ de benzocaína para os adultos de sardinha. Foi observado também que o tamanho tem uma relação positiva com o tempo de indução e recuperação da sardinha.

REFERÊNCIAS

- CERQUEIRA, V. R. et al. Sustainable use of the Brazilian sardine for fishing the skipjack tuna. In: World Aquaculture 2011, 2011, Natal - RN. WAS 2011 **Abstracts**. Natal-RN : World Aquaculture Society, 2011. v. 1. p. 238-238.
- CLARKE, A.; JOHSTON, N.M. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleosts fish. **Journal of Animal Ecology**, v. 68, p. 893-905, 1999.
- GOMES, L. C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.
- HOSKENEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p.1136-1142, 2004.
- IBAMA 2005. **Estatística Pesqueira Nacional 2003**. Brasília, jun. 2005.
- IBAMA, 2006. **Reunião Técnica sobre o Estado Atual da Arte e Ordenamento da Pesca de Sardinha-Verdadeira nas regiões sudeste e sul**. Itajaí: IBAMA/CEPSUL, p. 90, 2006.
- IWAMA G.K. et al. The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**. v.67, p. 2065-2073, 1989.
- IVERSEN et al. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM and Benzoak1 as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**. v. 221, p. 549–566, 2003.

- 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.
- OIKAWA S.; ITAZAWA, Y. Gill and body surface areas of the carp in relation to bodymass, with special reference to the metabolism-size relationship. **Journal of Experimental Biology**, v. 117, p.1-14, 1985.
- OKAMOTO, M. H. et al. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*). **Ciência Rural**, v. 39n n. 3, p. 866-870, 2008.
- ORTUÑO, J. et al. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish Shellfish Immunol**, v.12, p. 49–59, 2002.
- ROUBACH, R. et al. Safest level of tricaine methanosulfanate (MS-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**, Oxon, v.36, v.11, p.1056-1061, 2005.
- TSANTILAS H. et al. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquaculture**, v. 253, p. 64-70, 2006.
- WOOD, C.A. et al. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: fi eld trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p. 340-347, 2002.
- ZAHL I.H et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadusmorhua*) - efect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, p.52-59, 2009.
- ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1235-1245, 2011.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

CARMICHAEL, G.J. et al. Confinement and water quality induced stress in largemouth bass. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.113, p. 767-777, 1984.

CERQUEIRA, V. R. et al. Sustainable use of the Brazilian sardine for fishing the skipjack tuna. In: World Aquaculture 2011, 2011, Natal - RN. WAS 2011 Abstracts. Natal-RN : World Aquaculture Society, 2011. v. 1. p. 238-238.

CHO, G.K; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.31, p.537- 546, 2000.

GOMES, L. C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.

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

HOSKENEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p.1136-1142, 2004.

IBAMA 2005. **Estatística Pesqueira Nacional 2003**. Brasília, jun. 2005.

IBAMA, 2006. **Reunião Técnica sobre o Estado Atual da Arte e Ordenamento da Pesca de Sardinha-Verdadeira nas regiões sudeste e sul**. Itajaí: IBAMA/CEPSUL, p. 90, 2006.

IBAMA, 2007. **Identificação e reprodução de espécies marinhas como alternativa de isca-viva, para a captura do bonito listrado, no litoral catarinense e viabilidade de manutenção em tanques-rede**. Itajaí: IBAMA/CEPSUL, p. 90, 2007.

- ISAAC-NAHUM, V. J. et al. Aspects of the spawning biology of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), (Clupeidae). **Journal of Fish Biology**. n. 32, v.3, p. 383-396, 1988.
- IVERSEN et al. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM and Benzoak1 as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**. v. 221, p. 549-566, 2003.
- KEENE J.L. et al. The efficacy of clove oil as na anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture research**, v. 29, p. 89-101, 1998.
- MARKING, L.L.; MEYER, F.P., 1985. Are better fish anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, Bethesda, v.10, n.6, p.2-5, 1985.
- MATSUURA, Y. O ciclo de vida da sardinha-verdadeira (introdução à oceanografia pesqueira). **Publ. Esp, Inst. Oceanogr.**, São Paulo, v. 4, p. 1-146, 1977.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201- 212. 1977.
- MEINERTZ, I. R. Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the fish anesthetic benzocaine. In: SMITH, D. J.; GINGERICH, W. H.; BECONI-BARKER, M. G. *Xenobiotics in fish*. **Dordrecht: Klumer Academic Publishers**, p.189-200, 1999.
- 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.
- OKAMOTO, M. H. et al. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*). **Ciência Rural**, v. 39n n. 3, p. 866-870, 2008.
- OLSEN, Y. A.; EINARSDOTTIR, I.E.; NILSSEN, K.J. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmon salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, v. 134, p. 155-168, 1995.

PEREIRA, H. L. **Manejo e maturação em cativeiro da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1897) no sul do Brasil**. 2010. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**, 2nd edn. Oxford Blackwell Science, p.159, 1999.

ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; SACCARDO, S. A.; CERGOLE, M.C. Are fluctuations in Brazilian Sardine catches related to global-scale climatic changes? **Anais Academia Brasileira de Ciências**, n. 68, V. 1, p. 239-250, 1996.

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

SACCARDO, S. A. et al. Age and growth of theSoutheastern Braziliansardine, *Sardinella brasiliensis*, 1981 – 83. **Boletim do Instituto Ocenográfico da Universidade de São Paulo**, v. 36, n. 1, p.17 – 35, 1988.

STAURNES, M.; SIGHOLT, T.; PEDERSEN, H.P.; RUSTAD, T. Physiological effects of simulated highdensity transport of atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v.119, p.381-391. 1994.

STRANGE, R.; SCHRECK, C.B.; GOLDEN, J.T. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.106, p.213-218. 1977.

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

VALENTINI, H.; CARDOSO, R. D.. Análise da pesca da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, na costa sudeste-sul do Brasil. **Atlântica**, Rio Grande, n.13, v. 1, p.:45-54, 1991.

VAZZOLER, A. E. A. M. Sobre a primeira maturação sexual e destruição de peixes imaturos. **Boletim do Instituto Ocenográfico da Universidade de São Paulo**, São Paulo, n.12, v. 2, p. 5-58, 1962.

VELISEK, J. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 310, p. 369-375, 2011.

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

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.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1235-1245, 2011.