

ANGELA EMI TAKAMURA

**EFEITO DE ANESTÉSICOS EM GIRINOS E RÃS PÓS-METAMÓRFICAS DE RÃ-
TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T136e Takamura, Angela Emi, 1978-
2011 Efeito de anestésicos em girinos e rãs pós-metamórficas
de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) / Angela Emi
Takamura. – Viçosa, MG, 2011.
xxxiv, 359f. : il. ; 29cm.

Orientador: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 320-359.

1. Anestésicos. 2. Rã touro. 3. Benzocaína. 4. Mentol.
5. Eugenol. 6. *Lithobates castesbeianus*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 597.892

ANGELA EMI TAKAMURA

EFEITO DE ANESTÉSICOS EM GIRINOS E RÃS PÓS-METAMÓRFICAS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de abril de 2011.

Dr. Rodrigo Fortes da Silva

Prof^a. Ita de Oliveira e Silva
(Co-Orientadora)

Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho
(Orientador)

A meu pai, pelo amor, carinho, compreensão, confiança e apoio incondicional.

À minha mãe, pelo amor, carinho e atenção.

Ao meu avô (*in memoriam*) pela confiança e carinho.

Aos meus irmãos, pela amizade, pelos risos e por estarem sempre ao meu lado, mesmo que a distância.

*“A compaixão para com os animais é das
mais nobres virtudes da natureza humana”*

(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, pela orientação, pelos conhecimentos, pela atenção, pela paciência e, principalmente, pela amizade.

À professora Ita de Oliveira e Silva, pela co-orientação, pela atenção e boa vontade.

Aos professores José Cola Zanúncio e Sérgio Luís Pinto da Matta, pela co-orientação e sugestões.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela simpatia, pela atenção e pelos ensinamentos.

À doutora Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, pela pessoa maravilhosa que é, pela amizade, pelo apoio e pelo carinho e generosidade.

Aos velhos amigos Pedro Azevedo, Fabiano Gomes, Aline Zampar, Mônica Lopes Paixão, Shirley Helena Mendes da Silva, pelo companheirismo, pelo apoio, pelas cachaçadas e risadas.

Aos amigos Claudio Barberini Camargo Filho, Marcelo Maia Pereira, Alan Reis Troni, Cristiano Demétrios e Leonardo Luis Calado, pelo apoio no momento em que retornei a Viçosa, pela amizade e, principalmente, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao colega de Ranário, que ao final de dois anos se tornou um grande amigo, Marcus Vinícius Gonçalves Rigueira Pinheiro Castro, pelo grande apoio prestado durante todas as fases deste trabalho, pela amizade, pelo carinho, pelas risadas e pelo Frog.

Aos colegas de Ranário Bruno Geovani Sacco Pinto Marques e Leonardo Comastri Arruda, pelo apoio, pela amizade e pelo convívio.

Aos funcionários e colegas do Ranário e Piscicultura, José Antonio de Freitas, Raimundo Antônio da Silva, Everaldo Gregório, Álvaro Magela Ferreira, Paulo Bernardo Soares, João Antonio de Oliveira, pela ajuda prestada, pelos conhecimentos e pelo convívio.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Biologia Animal Adnilson Antonio Brasileiro, Rita Maria Alves de Souza Gomes e Lúcia Helena Campos, pela atenção, pelo apoio e pela alegria.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Animal.

A todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho.

BIOGRAFIA

ANGELA EMI TAKAMURA, filha de Luiz Takamura e Katsumi Takamura, nasceu em 11 de outubro de 1978, em São José dos Campos, São Paulo.

Graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa. MG, em março de 2003.

Em agosto de 2008, iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Viçosa, na área de Zoologia, submetendo-se à defesa de tese em 15 de abril de 2011.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xxii
RESUMO.....	xxxii
ABSTRACT.....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Sistema Sensorial	7
3.2. Mecanismos de Ação dos Receptores.....	10
3.3. Receptores Sensoriais em Anfíbios	10
3.3.1. Receptores Tegumentários	10
3.3.2. Receptores Visuais	12
3.3.3. Receptores Sensoriais em Girinos.....	13
3.3.3.1. Receptores da Linha Lateral	13
3.4. Bem-estar Animal.....	14
3.5. Definição de Estresse	15
3.5.1. Respostas Fisiológicas ao Estresse.....	17
3.5.2. Respostas Neuroendócrinas ao Estresse	19
3.5. Dor e Nocicepção.....	20
3.7. Sedação, Analgésia e Anestesia.....	23
3.7.1. Definição	23
3.7.2. Técnicas de Indução à Anestesia	23

	Página
3.7.3. Características Desejáveis de um Composto Anestésico	24
3.8. Anestésicos Locais.....	25
3.8.1. Mecanismo de Ação	26
3.8.2. Metabolismo e Excreção	27
3.9. Principais Compostos ou Agentes Anestésicos utilizados em Pecilotérmicos.....	28
3.9.1. Benzocaína	29
3.9.1.1. Acúmulo e Eliminação	30
3.9.1.1.1. Plasma	31
3.9.1.1.2. Tecidos.....	31
3.9.2. Eugenol	32
3.9.2.1. Mecanismo de Ação.....	33
3.9.2.2. Acúmulo e Eliminação.....	34
3.9.2.2.1. Plasma	34
3.9.2.2.2. Tecidos.....	35
3.9.3. Mentol	36
3.9.3.1. Mecanismo de Ação.....	37
3.9.3.2. Acúmulo e Eliminação.....	38
3.10. Estágios de Anestesia.....	39
3.10.1. Fatores que Afetam a Resposta Anestésica	40
3.11. Uso de Anestésicos em Anfíbios.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Fase 1 – Girinos I	44
4.2. Fase 1 – Girinos II	49
4.3. Fase 2 – Imagos, Juvenis e Adultos	54
4.4. Análise Estatística	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
5.1. Fase 1 – Girinos I.....	65

	Página
5.1.1. Eugenol	66
5.1.1.1. Faixa Etária: 15 dias.....	66
5.1.1.2. Faixa Etária: 30 dias.....	73
5.1.1.3. Faixa Etária: 45 dias.....	80
5.1.1.4. Faixa Etária: 60 dias.....	86
5.1.1.5. Faixa Etária: 75 dias.....	92
5.1.2. Mentol.....	101
5.1.2.1. Faixa Etária: 15 dias.....	102
5.1.2.2. Faixa Etária: 30 dias.....	109
5.1.2.3. Faixa Etária: 45 dias.....	114
5.1.2.4. Faixa Etária: 60 dias.....	117
5.1.2.5. Faixa Etária: 75 dias.....	123
5.1.3. Benzocaína	132
5.1.3.1. Faixa Etária: 15 dias.....	133
5.1.3.2. Faixa Etária: 30 dias.....	135
5.1.3.3. Faixa Etária: 45 dias.....	140
5.1.3.4. Faixa Etária: 60 dias.....	142
5.1.3.5. Faixa Etária: 75 dias.....	146
5.1.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol	153
5.2. Fase 1 – Girinos II	158
5.2.1. Benzocaína	158
5.2.1.1. Faixa Etária: 30 dias.....	158
5.2.1.2. Faixa Etária: 45 dias.....	162
5.2.1.3. Faixa Etária: 60 dias.....	165
5.2.1.4. Faixa Etária: 75 dias.....	168
5.2.2. Eugenol	172
5.2.2.1. Faixa Etária: 30 dias.....	172

	Página
5.2.2.2. Faixa Etária: 45 dias.....	175
5.2.2.3. Faixa Etária: 60 dias.....	178
5.2.2.4. Faixa Etária: 75 dias.....	180
5.2.3. Mentol	184
5.2.3.1. Faixa Etária: 30 dias.....	184
5.2.3.2. Faixa Etária: 45 dias.....	187
5.2.3.3. Faixa Etária: 60 dias.....	189
5.2.3.4. Faixa Etária: 75 dias	191
5.2.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol	194
5.2.4.1. Faixa Etária: 30 dias	195
5.2.4.2. Faixa Etária: 45 dias.....	199
5.2.4.3. Faixa Etária: 60 dias	204
5.2.4.4. Faixa Etária: 75 dias.....	207
5.3. Fase 2 – Imagos, Juvenis e Adultos	213
5.3.1. Benzocaína	215
5.3.1.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)	215
5.3.1.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)	226
5.3.1.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)	233
5.3.1.3. Classe de Peso 4 (120g – 160g)	239
5.3.2. Eugenol	245
5.3.4.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)	246
5.3.4.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)	256
5.3.4.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)	263
5.3.4.4. Classe de Peso 4 (120g – 160g)	272
5.3.5. Mentol	280
5.3.5.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)	280
5.3.5.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)	288

	Página
5.3.5.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)	297
5.3.5.4. Classe de Peso 4 (120g – 160g)	304
5.3.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol	311
6. CONCLUSÕES.....	318
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	320

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Identificação dos estágios de anestesia e descrição da resposta comportamental em peixes	39
TABELA 2 - Síntese de alguns anestésicos utilizados em anfíbios por meio do método de imersão.....	41
TABELA 3 - Concentrações (mg/L) mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação e à anestesia em girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) em diferentes faixas etárias	48
TABELA 4 - Temperatura da água e do ambiente (°C) aferidos no início da indução anestésica, por meio da benzocaína, eugenol e mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas etárias.....	52
TABELA 5 - Concentrações (mg/L) mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação em girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas etárias.....	54
TABELA 6 - Número de animais por tratamento e número total de animais por classe de peso, de imagos, juvenis e adultos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), submetidos, a dez tratamentos por classe de peso, a benzocaína, eugenol e mentol	55
TABELA 7 - Médias e desvios de peso (g) e CRC (mm) de imagos (5 a 10g e 20 a 30g), juvenis (80 a 100g) e adultos (120 a 160g) de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) nos três avaliados (benzocaína, eugenol e mentol)	56
TABELA 8 - Médias e desvios das temperaturas da água e do ambiente, por anestésico e por classe de peso de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) induzidos à sedação e à anestesia.....	59
TABELA 9 - Concentrações mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação e à anestesia de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas de peso.....	63
TABELA 10 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	69

TABELA 11 - Equações de regressão ajustadas para as variáveis tempos de indução (TI_{ane}), tempos de manutenção (TM_{ane}) e tempos de retorno (TR_{ane}) à anestesia, em função da concentração de eugenol em girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias.....	73
TABELA 12 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias.	76
TABELA 13 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias	82
TABELA 14 - Tempo de indução à anestesia, em minutos, e as respectivas freqüência relativas, em porcentagem, em função das concentrações de eugenol utilizada	85
TABELA 15 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação em função da concentrações de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias	88
TABELA 16 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	93
TABELA 17 - Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações seguras, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), de acordo com a faixa etária, em dias.....	100
TABELA 18 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	105
TABELA 19 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias	111
TABELA 20 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias	115

TABELA 21 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias.	119
TABELA 22 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	124
TABELA 23 - Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações mais indicadas, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), de acordo com a faixa etária, em dias	131
TABELA 24 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	134
TABELA 25 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias	138
TABELA 26 - Tempos de retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias	138
TABELA 27 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração da benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias	140
TABELA 28 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias	143
TABELA 29 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	147

TABELA 30 - Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações mais indicadas, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), de acordo com a faixa etária, em dias	151
TABELA 31 - Esquema de pontuação dos compostos anestésicos (eugenol, benzocaína e mentol), por faixa etária, em função das características: concentração, tempo de indução, tempo de manutenção	156
TABELA 32 - Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição à benzocaína	171
TABELA 33 - Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição à benzocaína	182
TABELA 34 - Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição ao mentol.....	193
TABELA 35 - Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de animais (NR), em porcentagem, de girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , na faixa etária de 30 dias, que retornaram ao estado normal após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol	196
TABELA 36 - Equações de regressão ajustadas do tempo de retorno (TR) e número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa etária de 30 dias, que retornaram ao estado normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico	199
TABELA 37 - Número de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após 24 horas indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína, eugenol e mentol	200
TABELA 38 - Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em porcentagem, após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas.....	202

TABELA 39 - Equações de regressão ajustadas do tempo de retorno (TR) e número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico.....	203
TABELA 40 - Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em porcentagem, após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas.....	206
TABELA 41 - Equações de regressão ajustadas de tempo de retorno (TR) e número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico.....	207
TABELA 42 - Tempo de retorno (TR), em minutos, de <i>Lithobates catesbeianus</i> , na faixa etária de 75 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas.....	210
TABELA 43 - Equações de regressão ajustadas de tempo de retorno (TR) e número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico.....	211
TABELA 44 - Classificação, identificação e descrição dos sinais fisiológicos e comportamentais dos estágios progressivos de sedação e anestesia em anuro, <i>Lithobates catesbeianus</i>	214
TABELA 45 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g gramas.....	219
TABELA 46 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g.....	222

TABELA 47 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g.....	223
TABELA 48 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g a 30g.....	227
TABELA 49 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g a 30g	229
TABELA 50 - Tempos de retorno, em minutos, dos diferentes estágios anestésicos, de imagos de <i>Lithobates catesbeianus</i> , pesando entre vinte a trinta gramas, em função da concentração de benzocaína, em mg/L.....	230
TABELA 51 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre oitenta a cem gramas	234
TABELA 52 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre oitenta a cem gramas.....	236
TABELA 53 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre oitenta a cem gramas	237
TABELA 54 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120g a 160g	241

TABELA 55 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120g a 160g.....	242
TABELA 56 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120g a 160g	243
TABELA 57 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g.....	250
TABELA 58 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g.....	252
TABELA 59 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5g a 10g.....	253
TABELA 60 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre vinte a trinta gramas	258
TABELA 61 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre vinte a trinta gramas	260
TABELA 62 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre vinte a trinta gramas	262

TABELA 63 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80 a 100 gramas.....	265
TABELA 64 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80g a 100g.....	267
TABELA 65 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80 a 100 gramas.....	268
TABELA 66 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas	273
TABELA 67 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas.....	275
TABELA 68 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas	277
TABELA 69 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre cinco a dez gramas	282
TABELA 70 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre cinco a dez gramas	285

TABELA 71 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 5 a 10 gramas.....	286
TABELA 72 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20 a 30 gramas.....	291
TABELA 73 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20 a 30 gramas.....	293
TABELA 74 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20 a 30 gramas.....	295
TABELA 75 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de juvenis rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80 a 100 gramas	299
TABELA 76 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80 a 100 gramas.....	301
TABELA 77 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (I ₁), à sedação profunda (I ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80 a 100 gramas.....	303
TABELA 78 - Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas	306

TABELA 79 - Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas	308
TABELA 80 - Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A ₁), à sedação profunda (A ₂), à anestesia leve (B ₁), à anestesia profunda (B ₂) e à anestesia cirúrgica (B ₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 a 160 gramas	309
TABELA 81 – Esquema de pontos dos compostos anestésicos (eugenol, benzocaína e mentol), por faixa etária, em função das características: concentração, tempo de indução, tempo de manutenção	313

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Componentes do sistema de linha lateral de girinos	14
FIGURA 2 - Girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) no interior da cuba de vidro contendo solução anestésica (A) sobre bandeja plástica com água aquecida (B).	47
FIGURA 3 - Amostra de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), com 45 dias de idade, sendo contadas e separadas para posterior indução anestésica.....	50
FIGURA 4 - Grupos de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) induzidos a sedação, por meio de diferentes concentrações de benzocaína, eugenol e mentol, simulando o transporte dos animais.....	51
FIGURA 5 - Exemplo de marcação, utilizando fios coloridos, segundo a metodologia de Camargo Filho (2008). A esquerda, juvenil de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) com marcação na pata direita (A) e à direita, imagos de rã-touro com marcação na cintura pélvica (B).....	57
FIGURA 6 - Imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) imersos em um litro de solução anestésica. Em detalhe, altura da solução em contato com o animal	58
FIGURA 7 - Imago de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), induzido a sedação, colocado sobre uma bancada plana, em decúbito dorsal, para avaliação da presença ou ausência de reflexo de equilíbrio.....	60
FIGURA 8 - Leve pressão, com auxílio de pinça cirúrgica, na pata traseira, de imago (A) e adulto (B) de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), para determinação de presença ou ausência de reflexo nociceptivo leve, após indução anestésica	61
FIGURA 9 - Leve pressão, com auxílio de uma haste flexível com ponta de algodão, na ocular de um exemplar adulto de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), para determinação de presença ou ausência de reflexo nociceptivo profundo, após indução anestésica.....	62
FIGURA 10 - Valores ajustados do tempo de indução à sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias, induzidos por meio de concentrações crescentes de eugenol.	70

FIGURA 11 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	71
FIGURA 12 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias.....	72
FIGURA 13 - Valores ajustados do tempo de retorno à sedação de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias, induzidos a sedação por meio de concentrações crescentes de eugenol.	77
FIGURA 14 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias	79
FIGURA 15 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias.....	79
FIGURA 16 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias.....	83
FIGURA 17 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias.....	85
FIGURA 18 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias.....	90
FIGURA 19 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias.....	94
FIGURA 20 - Tempo médio do restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias, induzidos por meio de concentrações crescentes de eugenol	95
FIGURA 21 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias.....	96

FIGURA 22 - Tempo médio de recuperação à anestesia de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias, induzidos por meio de concentrações crescentes de eugenol	97
FIGURA 23 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	106
FIGURA 24 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 15 dias	108
FIGURA 25 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias.....	112
FIGURA 26 - Valores ajustados pela regressão dos tempos manutenção à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias	113
FIGURA 27 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias.....	119
FIGURA 28 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias.....	120
FIGURA 29 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias.....	122
FIGURA 30 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias.....	125
FIGURA 31 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	126

FIGURA 32 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de menol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.....127

FIGURA 33 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução e retorno (A) e dos tempos de manutenção (B) à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.128

FIGURA 34 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.135

FIGURA 35 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução e manutenção à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias138

FIGURA 36 - Valores médios dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias.....139

FIGURA 37 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias141

FIGURA 38 - Valores ajustados pela regressão dos tempos manutenção à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias142

FIGURA 39 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias144

FIGURA 40 - Valores ajustados pela regressão dos tempo de indução à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias144

FIGURA 41 - Valores ajustados pela regressão dos tempo de retorno à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias145

FIGURA 42 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	148
FIGURA 43 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução e manutenção à anestesia em função da benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias	149
FIGURA 44 - Gráfico das concentrações recomendadas (mg/L), para sedação e anestesia, e os respectivos valores ajustados de indução, manutenção e retorno, em minutos, em função da faixa etária (15, 30, 45, 60 e 75 dias) e anestésico (eugenol=E; benzocaína=B; mentol=M).....	154
FIGURA 45 - Valores ajustados pela regressão do número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> em função da concentração da solução de benzocaína, na faixa etária de 30 dias.	160
FIGURA 46 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), com 30 dias de idade.....	161
FIGURA 47 - Valores ajustados pela regressão do número de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) com 30 dias de idade, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol.	162
FIGURA 48 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.....	164
FIGURA 49 - Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>) com 45 dias de idade, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína....	164
FIGURA 50 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.....	167

FIGURA 51 - Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.....	168
FIGURA 52 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.....	170
FIGURA 53 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol.	175
FIGURA 54 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol	177
FIGURA 55 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 30 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de mentol	186
FIGURA 56 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de mentol	188
FIGURA 57 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias, após indução anestésica, por meio de imersão, em concentrações crescentes de mentol.	190
FIGURA 58 - Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (<i>L. catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias, após indução anestésica, por meio de imersão, em concentrações crescentes de mentol	192

FIGURA 59 - Valores ajustados pela regressão do número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa de 30 dias, induzidos à sedação, em função da concentração para a variável anestésico	196
FIGURA 60 - Valores ajustados do número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa de 30 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária	197
FIGURA 61 - Valores ajustados do número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa etária de 45 dias, induzidos à sedação, em função da concentração para a variável anestésico	201
FIGURA 62 - Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 60 dias, induzidos à sedação, por meio de imersão, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária.....	205
FIGURA 63 - Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), na faixa etária de 75 dias, induzidos à sedação, por meio de imersão, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária	208
FIGURA 64 - Valores ajustados do número de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , na faixa de 75 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica, em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária	209
FIGURA 65 - Gráfico comparativo das concentrações recomendadas (mg/L) e dos respectivos tempos de recuperação (minutos) entre a benzocaína e o mentol	211
FIGURA 66 - Valores ajustados do tempo de indução à anestesia profunda de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre cinco e dez gramas, induzidos por meio de concentrações crescentes de benzocaína.	221
FIGURA 67 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3) em função da concentração de benzocaína, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre vinte e trinta gramas.....	228
FIGURA 68 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia cirúrgica em função da concentração de benzocaína, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre oitenta a cem gramas	251
FIGURA 69 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica em função da concentração de eugenaol, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre vinte e trinta gramas	261

FIGURA 70 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve (A_1) e à sedação profunda (A_2) em função da concentração de eugenol, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80g e 100g	269
FIGURA 71 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia leve (B_1) em função da concentração de eugenol, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre oitenta e cem gramas.....	270
FIGURA 72 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2) e à anestesia leve (B_1) em função da concentração de eugenol, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120g e 160g	274
FIGURA 73 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (B_2) em função da concentração de eugenol, de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120 e 160 gramas.....	276
FIGURA 74 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal, à sedação (leve e profunda) (A) e dos tempos de retorno à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) (B) em função da concentração de eugenol, rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 120g e 160g	278
FIGURA 75 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia leve (B_1) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g e 30g	292
FIGURA 76 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (A) e cirúrgica (B) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g e 30g	294
FIGURA 77 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (B_2) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g e 30g.....	294
FIGURA 78 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 20g e 30g	296
FIGURA 79 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação profunda (A_2) em função da concentração de mentol, de juvenis de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>), pesando entre 80g e 100g	299

FIGURA 80 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação leve (A_1) em função da concentração de mentol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80 e 100 gramas302

FIGURA 81 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal em função da concentração de mentol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80 e 100 gramas303

FIGURA 82 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação profunda (A_2) e à anestesia leve (B_1) em função da concentração de mentol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g308

FIGURA 83 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal (A), à sedação leve (B), à sedação profunda (C) e à anestesia leve (D) em função da concentração de mentol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.....310

FIGURA 84 - Gráficos comparativos das concentrações recomendadas (mg/L) para indução à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1), à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3) da benzocaína, do eugenol e do mentol, em função da classe de peso avaliada 5g-10g (1), 20g-30g (2), 80g-100g (3) e 120g-160g (4)314

RESUMO

TAKAMURA, Angela Emi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011. **Efeito de anestésicos em girinos e rãs pós-metamórficas de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Orientador: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Co-orientadores: Ita de Oliveira e Silva, Sérgio Luís Pinto da Matta e José Cola Zanúncio.

Com o intuito de avaliar o uso de três anestésicos locais, entres eles, o eugenol, o mentol e a benzocaína, como indutores à sedação e à insensibilização de girinos e rãs pós-metamórficas da espécie *Lithobates catesbeianus*, em diferentes estágios de desenvolvimento, realizou-se este experimento no Laboratório do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi dividido em três partes: Fase 1 – Girinos I, em que cada anestésico foi avaliado quanto ao tempo necessário para a indução e retorno à sedação e à anestesia, de quatrocentos girinos, nas faixas etárias de 15, 30, 45, 60 e 75 dias de idade; a Fase 1 – Girinos II, realizada com o intuito de simular o transporte de girinos de rã-touro, em quatro faixas etárias (30, 45, 60 e 75 dias de idade), sob a ação dos três anestésicos; e a Fase 2 – Imagos, Juvenis e Adultos, em que cada anestésico foi avaliado quanto ao tempo necessário para a indução e retorno à sedação e à anestesia, de quatrocentos animais pós-metamórficos, em quatro classes de peso distintas (5g-10g; 20g-30g; 80g-100g; 120g-160g). Na primeira fase, nos períodos de indução e de recuperação os animais foram avaliados a cada 15 minutos, por um período de 180 minutos, quanto à presença ou ausência de reflexo de fuga e sentido de nocicepção. Na fase seguinte, para cada um dos três anestésicos foram separados, seis a oito grupos, contendo 200 girinos cada, que, em seguida, foram acondicionados em sacos plásticos, medindo 50 cm x 60 cm, contendo 10 litros de solução anestésica (água + anestésico), em concentrações crescentes, e oxigênio. Observou-se o número de animais induzidos à sedação, caracterizado pela ausência de movimento dos girinos mesmo após estímulo externo (movimentação dos sacos), e o tempo de recuperação, a princípio, a cada 1 hora, durante as 5 horas iniciais e,

posteriormente, somente após 24 horas. Na Fase 2, os animais foram avaliados, individualmente, a cada 15 minutos por um período de 5 horas (período de indução), quanto à frequência respiratória, à presença ou ausência de reflexo de fuga e de equilíbrio, e quanto à sensibilidade a nocicepção leve e a nocicepção profunda. Passados às cinco horas, os animais foram transferidos para a água livre de anestésicos onde, então, foi acompanhado o tempo necessário para que os animais restabelecessem o comportamento normal (período de recuperação). Tanto a benzocaína quanto o mentol e o eugenol são eficazes na indução de rãs-touro pré e pós-metamórficos à sedação e à anestesia. Na Fase 1- Girinos I, o eugenol apresentou os melhores resultados quanto à concentração utilizada e aos tempos de indução, manutenção e retorno, tanto à sedação quanto à anestesia de girinos de rã-touro, enquanto que o mentol e a benzocaína apresentaram resultados equivalentes. Durante a simulação de transporte de animais pré-metamórficos e na fase pós-metamórfica (5g a 160g), o mentol e a benzocaína apresentara os melhores resultados. Uma vez que, o mentol e a benzocaína são equivalentes, a escolha entre um ou outro fica a critério do operador, que deverá optar aquele de melhor custo-benefício.

ABSTRACT

TAKAMURA, Angela Emi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011.
Anesthetic effects on tadpoles and post-metamorphic frogs of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Coadvisers Members: Ita de Oliveira e Silva, Sérgio Luís Pinto da Matta and José Cola Zanúncio.

In order to evaluate the use of three local anesthetic (benzocaine, clove oil and menthol) to sedation and desensitization of tadpoles and post-metamorphic animals of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) at different stages of development one experiment was took place on the Experimental Laboratory of Federal University of Viçosa. The experiment was divided into three phases: Phase 1 - Tadpoles, in which each anesthetic was assessed by four hundred tadpoles at 15, 30, 45, 60 e 75 days of age for the time required to induction and return to sedation and anesthesia; Phase 1 - Part B, was held in order to simulate the tadpoles transport of four groups at different ages (30, 45, 60 and 75 days) under the action of the three local anesthetic; Phase 2 – Youth, Juvenile and Adult, in which each anesthetic was assessed for the time required for induction and return to sedation and anesthesia of four hundred post-metamorphic animals at different class of age (5g-10g; 20g-30g; 80g-100g and 120g-160g). In the first phase, during induction and recovery the animals were evaluated every 15 minutes during a period of 180 minutes by the presence or absence of escape reflex and sense of nociception. On the second phase for each local anesthetic six to eight groups each one with 200 tadpoles were put in plastic bags measuring 50cm X 60cm with 10 liters of anesthetic solution (water + anesthetic) and oxygen. The number of animals induced to sedation characterized by the absence of movement of tadpoles even after the external stimulus (movement of the bags), and the recovery time were observed every 1 hour on the first five hours and then only after 24 hours. In the third phase, to the determination of the best anesthetic compound, the withdrawal reflex, righting reflex, respiratory frequency and sensitivity to light and deep nociception were used to

evaluate central nervous system depression following bath administration on each animal in which each class of weight evaluated every 15 minutes for a period of 5 hours (induction period). After this period, the animals were transferred to anesthetic-free water which was then monitored to establish the time required for animals to return the normal behavior (recovery period). In tadpoles of bullfrog menthol and benzocaine showed similar results for both sedation and anesthesia. In all groups of age the most effective anesthetic agents for sedation of bullfrog tadpoles for 24 hours were benzocaine and menthol. Benzocaine, menthol and clove oil are effective agents in the induction of tadpoles and post-metamorphic frog of bullfrogs to sedation and anesthesia. In Phase 1 - Tadpole I, clove oil showed the best results on the concentration used and the time of induction, maintenance and return for sedation and anesthesia of bullfrog tadpoles, while menthol and benzocaine showed similar results. During the simulation transport of pre-metamorphic animals and post-metamorphic animals (5g to 160g) anesthesia, menthol and benzocaine showed the best results. Since menthol and benzocaine are equivalent, the choice between one or the other is at the discretion of the operator, one should choose the most cost-effective.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, um grande número de pesquisas vem se desenvolvendo a respeito do estresse em peixes causados, principalmente, pelo manejo inadequado e transporte desses animais, que além de levar ao enfraquecimento do indivíduo, devido à redução no consumo de alimentos e/ou queda na eficiência da digestão, pode predispor o animal a doenças, pela redução da adaptabilidade às flutuações do meio; afetar o crescimento e até mesmo a reprodução (MAZEAUD *et al.*, 1977; MAULE *et al.*, 1987; POTTINGER e PICKERING, 1990; PICKERING *et al.*, 1991; PICKERING, 1993; McDONALD e ROBINSON, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1994; BARTON, 1997; TORT *et al.*, 1996; WARING *et al.*, 1996; WENDELAAR BONGA, 1997; McCORMIK *et al.*, 1998; ARENDS *et al.*, 1999; BARTON, 2002; SMALL, 2004).

Uma vez que, a atenção e a preocupação com o estresse em peixes têm aumentado devido aos seus efeitos negativos, tanto produtivos quanto econômicos, algumas técnicas foram desenvolvidas visando o alívio ou redução do estresse, por meio de sedação e anestesia (URBINATI e CARNEIRO, 2005; INOUE *et al.*, 2005; BOLASINA, 2006; CUNHA, 2007; ROSS *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; IVERSEN *et al.*, 2009; HEO e SHIN, 2010).

A sedação (efeito calmante) e a anestesia (perda das sensações ou insensibilização) podem ser induzidas por uma ampla variedade de técnicas, entre elas físicas como, por exemplo, hipotermia e estímulo elétrico; e químicas como, inalação, aspersão, imersão ou aplicação de drogas químicas (ROSS e ROSS, 2008).

Em animais peilotérmicos, atualmente, as técnicas mais utilizadas para anestesia são realizadas por meio de inalação, aspersão, imersão ou aplicação de substâncias anestésicas. Para o uso da técnica de inalação, os gases comumente empregados são dióxido de carbono, dióxido de carbono de bicarbonato de sódio e hidrocarbonetos fluorados (ROSS e ROSS, 2008). Com relação à aspersão, os mesmos compostos químicos usados na imersão podem também ser aplicados para esta técnica, entre eles, podemos citar: benzocaína, MS-222 (tricáína metanosulfonato), quinaldina, 2-fenoxietanol, metomidato e etomidato (ROUBACH e GOMES, 2001; ROSS e ROSS, 2008). Por meio das vias intraperitoneal, intravascular ou intramuscular, as drogas químicas frequentemente injetadas são: alfaxolona-alfadolone, quetamina e pentobarbitol (ROSS e ROSS, 2008). Entretanto, a maioria dos compostos citados anteriormente tem, comprovadamente, efeitos irritantes, não só para os animais como também para os operadores (BERNSTEIN *et al.*, 1997; INOUE *et al.*, 2003; PIRHONEN e SCHRECK, 2003; ROSS e ROSS, 2008).

Assim, devido à necessidade de se descobrir novos compostos, mais seguros e eficazes, têm-se sugerido a avaliação e o uso de anestésicos menos invasivos, sendo os compostos naturais uma alternativa viável. Entre as substâncias naturais, com propriedades anestésicas, facilmente encontradas, no Brasil, podemos citar: o eugenol ou óleo de cravo e o mentol (FAÇANHA e GOMES, 2005).

Embora o uso de anuras tanto para fins científicos (pesquisa, principalmente) quanto para fins comerciais (produção) venha crescendo nos últimos anos, ainda existem poucos estudos visando à redução do estresse e o bem-estar desse grupo, visto que, os sinais de estresse nesses animais são difíceis de serem identificados. Os poucos estudos avaliando o uso de anestésicos nesse grupo são recentes e a

maioria deles, específicos a determinadas espécies, não encontradas no Brasil, como *Rana pipiens* (LAFORTUNE *et al.*, 2001; ÇAKIR E STRAUCH, 2005; MITCHELL, 2009), espécie nativa da América do Norte (Canadá e EUA) muito utilizada em pesquisas científicas e ensino (DEWEY, 1999) e *Xenopus laevis* (GUENETTE *et al.*, 2007; REED, 2005; MITCHELL, 2009), uma espécie introduzida na América do Norte, e que tem sido utilizada em inúmeras pesquisas, principalmente, na área de embriologia dos vertebrados (GARVEY, 2000).

No Brasil, a espécie *Lithobates catesbeianus*, conhecida popularmente como rã-touro, foi introduzida, na década de 30, com o objetivo de solidificar a ranicultura no país, devido a suas características zootécnicas, como precocidade e prolificidade, superiores aos anfíbios anuros nativos (*Leptodactylus labyrinthicus*, rã-pimenta; *Leptodactylus latrans*, rã-manteiga), além de grande rusticidade, o que favoreceu a adaptação desses animais não só ao clima, como também ao cativeiro, sendo a única espécie utilizada para fins comerciais.

Não só a facilidade de obtenção ou aquisição de *R. pipiens* e *X. laevis*, na América do Norte, e de *L. catesbeianus*, no Brasil, como também as semelhanças, tanto morfológicas quanto fisiológicas, para com os vertebrados superiores (STORER e USINGER, 1977; MINKOFF, 1975) têm feito desses anuros, fontes indispensáveis de material biológico para experimentação acadêmica e científica em diversas áreas, como citogenética, morfologia e fisiologia (GARVEY, 2000).

Como não podemos assumir como verdadeiro a hipótese de que todas as mais de 4500 espécies de anfíbios (STEBBINS E COHEN, 1995; WILSON, 1997) vão responder à anestesia da mesma forma, uma vez que, variações entre e dentro indivíduos da mesma espécie foram reportados, principalmente, com relação aos

estágios de anestesia atingidos e duração da ação do fármaco (LAFORTUNE *et al.*, 2001), e considerando que todos os animais vertebrados são seres sencientes, ou seja, capazes de experimentar o sofrimento, seja a nível físico e/ou psíquico e, que, uma das diretrizes do bem-estar animal prega que todo o experimento ou manejo que causem dor ou desconforto devem ser realizados com analgesia e anestesia apropriada à espécie (Resolução Nº 879, de 15 de Fevereiro de 2008 - Conselho Federal de Medicina Veterinária, CFMV), o trabalho foi realizado com o intuito de auxiliar e ampliar os conhecimentos do uso de anestésicos em anfíbios anuros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de três anestésicos locais, dos quais dois são compostos naturais (o eugenol e o mentol) e um sintético (benzocaína), como indutores à sedação e à insensibilização de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes estágios de desenvolvimento, por meio da técnica de imersão.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as concentrações mínimas e máximas, para sedação e anestesia, dos três anestésicos avaliados (benzocaína, eugenol e mentol), em girinos de rã-touro em diferentes faixas etárias (15, 30, 45, 60 e 75 dias de idade);

Determinar o tempo de indução (sedação e anestesia) e recuperação, para os três anestésicos avaliados, em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias (15, 30, 45, 60 e 75 dias de idade), em ambiente controlado e situação de transporte;

Avaliar a mortalidade dos girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias, após a simulação de transporte;

Determinar as concentrações mínimas e máximas, para sedação e anestesia, de três anestésicos (benzocaína, eugenol e mentol), nas diferentes fases de desenvolvimento de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pós-metamórficas;

Determinar o tempo de indução, manutenção e recuperação, para sedação e anestesia, dos três anestésicos avaliados, nas diferentes fases de desenvolvimento de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pós-metamórficas;

Determinar os estágios anestésicos atingidos pela rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pós-metamórficas, nas diferentes fases de desenvolvimento avaliadas;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SISTEMA SENSORIAL

As células sensoriais são células especializadas na captação de estímulos ou informações específicas do meio (pressão, calor, luz, entre outros) que possuem, em suas membranas plasmáticas, proteínas receptoras responsáveis pela detecção de estímulos e desencadeamento da abertura ou fechamento dos canais iônicos, que são a chave para todas as manifestações de vida, sendo encontrados tanto em animais unicelulares como, por exemplo, bactérias e protozoários, quanto em mamíferos (SHERWOOD *et al.*, 2005).

Em animais superiores, o número e o tipo de células sensoriais são bastante extensas, muito mais do que o clássico “cinco sentidos”, frequentemente, ensinados (SHERWOOD *et al.*, 1999). No geral, muitos fisiologistas reconhecem a existência de três grupos sensoriais, sendo: os exteroceptores, que detectam os estímulos externos como, por exemplo, toque, luminosidade, temperatura, som e estímulos químicos; os interoceptores, também chamados de viscerosceptores, responsáveis pela detecção de informações do interior do corpo, muitas delas cruciais para a homeostase do organismo, tais como: pressão sanguínea e concentração de O₂; e os proprioceptores que informam sobre a posição e o movimento do corpo e o grau de estiramento ou força da contração muscular. Os proprioceptores estão localizados, principalmente, nos músculos, tendões e ligamentos, enquanto que, os interoceptores estão localizados em inúmeros sítios, em geral, em associação com os vasos sanguíneos e fluidos intestinais. As informações vindas dos exteroceptores

podem ser classificadas em sentidos somestésicos, quando originados de diferentes partes da superfície do corpo, e em sentidos especiais, quando advindos de receptores extremamente especializados, que respondem a um estímulo único do ambiente, e fazem parte de órgãos dos sentidos especiais, tais como: visão, olfação, gustação, audição e equilíbrio (NISHIDA, 2007).

Além da classificação dos receptores citada, anteriormente, em extero, intero e proprio, ou seja, pela localização da fonte estimuladora, os receptores podem ser categorizados de acordo com o tipo de energia a que são mais sensíveis, visto que, estes funcionam como filtros seletivos e específicos, sendo: fotorreceptores, sensíveis a luz, incluindo ultravioleta e infravermelho; mecanoreceptores, sensíveis a estímulos mecânicos; quimiorreceptores, captam alterações químicas específicas como, por exemplo, os exteroceptores para cheiro e sabor e os interoceptores que detectam concentrações sanguíneas de O₂ e CO₂; termorreceptores sensíveis ao calor e ao frio; nociceptores, detectam estímulos que possam causar danos teciduais; eletorreceptores, sensíveis a alterações em campos elétricos e, finalmente, magnetorreceptores, captam alterações dos campos magnéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2002; SHERWOOD *et al.*, 2005).

Assim, cada tipo de receptor é especializado para um determinado tipo de estímulo, informando ao sistema nervoso apenas sobre determinados aspectos ou dimensões do ambiente, seja interno ou externo. Todavia, um receptor pode ser ativado, em menor grau, por outro estímulo, não específico. Por exemplo, os receptores localizados nos olhos (fotorreceptores) são sensíveis à luz, sendo o estímulo mais adequado para esse receptor as alterações de luminosidade. Todavia, os fotorreceptores podem ser ativados por meio de estímulos mecânicos como, por

exemplo, ao pressionamos os olhos, vemos clarões ou “estrelas”, devido à estimulação mecânica dos fotorreceptores (SHERWOOD *et al.*, 1999).

Um receptor pode ser tanto um terminal especializado de um neurônio aferente quanto uma célula separada, associada ao terminal de um neurônio aferente. Porém, todos os receptores têm uma característica comum: são transdutores, isto é, mudam a energia de uma forma para outra. O sentido de tato na pele resulta da conversão de energia mecânica e / ou térmica em energia elétrica (correntes iônicas) do impulso nervoso. Assim, as células receptoras, que são incapazes de gerar um impulso de ativação por si, geram um potencial, de aumento gradual, que desencadeia a ativação das fibras nervosas aferentes a que estão ligados (SHERWOOD *et al.*, 2005).

As informações detectadas pelos receptores e conduzidas ao sistema nervoso central (SNC) são de grande importância para a sobrevivência do organismo, uma vez que, as informações, vindas via aferente, são essenciais tanto para o controle do comportamento motor, conforme as circunstâncias externas, quanto para a coordenação das atividades internas, a fim de manter a homeostase do organismo; o processamento das informações sensoriais, pelo sistema de ativação reticular do tronco cerebral, é de fundamental importância para a excitação cortical e consciência; o processamento central de informações sensoriais dá origem à percepção do animal do ambiente ao seu redor; e as informações coletadas e selecionadas pelo SNC podem ser armazenadas para referências futuras (SHERWOOD *et al.*, 2005).

3.2. MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES

A excitação de um receptor leva a alteração da permeabilidade de sua membrana plasmática que, em geral, leva a abertura de canais iônicos não seletivos, ocorrendo uma pequena despolarização local. Assim, um estímulo (luminoso, térmico e químico) faz com que canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem se abram e permitam um fluxo de correntes iônicas de um lado para o outro da célula (potencial local), ocorrendo, simultaneamente, um fluxo de Na^+ , de fora para dentro, que tende a despolarizar ainda mais a membrana, e um fluxo de K^+ , de dentro para fora, que tende a repolarizá-la (PIRES e CONSTANTINO, 2007).

Os canais de Na^+ somente voltam a ser estimulados depois que a membrana estiver totalmente repolarizada. Todo esse processo de despolarização e repolarização da membrana levam, aproximadamente, um milissegundo (PIRES e CONSTANTINO, 2007), dos quais 30% são utilizados na despolarização e, o restante, 70% na repolarização (COVINO e VASSALO, 1985).

O processo de excitação e condução de estímulos nervosos pode ser afetado por uma grande variedade de compostos químicos, dentre elas podemos citar: os anestésicos locais (SCHOLZ, 2002), as neurotoxinas (CESTELE e CATTERALL, 2000), as drogas anti-arrítmicas (KATZ, 1998) e as anti-epiléticas (RASGADALE e AVOLI, 1998).

3.3. RECEPTORES SENSORIAIS EM ANFÍBIOS ADULTOS

3.3.1. Receptores Tegumentários

Embora o tegumento seja a interface estrutural e funcional entre o organismo e o seu ambiente, a complexidade morfológica e funcional da pele dos anfíbios ainda não é completamente compreendida (DUELLMAN E TRUEB, 1994).

Uma vez que, a pele dos anfíbios é permeável à água, ela desempenha um importante papel na respiração, osmoregulação e termoregulação. Um dos receptores encontrados no tegumento, não só na fase larval de anuros como também em salamandras aquáticas adultas e em animais adultos das famílias pipidae e salamandridae, é o sistema da linha lateral, um sistema formado por um conjunto de órgãos sensoriais (neuromastos), distribuídos na cabeça e ao longo do corpo. Cada um desses órgãos tem função mecanoreceptora, captando alterações na corrente e na pressão da água, e são formados por três tipos de células, as do manto localizados na periferia, as de suporte que se estendem desde a membrana basal até a superfície e, por fim, as sensoriais na parte apical (DUELLMAN e TRUEB, 1994).

Outros receptores relacionados às sensações de frio, calor e estímulo tátil podem ser encontrados na epiderme, enquanto que os ligados a nocicepção e pressão local encontram-se na derme (CATTON, 1976; SPRAY, 1976). Em anfíbios, ao contrário dos mamíferos, apenas três grupos de terminais nervosos aferentes foram identificados. Um grupo localizado na camada mais superficial da derme (estrato esponjoso), classificado como terminais nervosos aferentes primários ou do tipo I, e dois grupos de terminais nervosos livres, um no estrato compacto e o outro na epiderme (SPRAY, 1976; FOX e WHITEAR, 1978; STEVENS, 2004). A nocicepção parece estar associada principalmente às terminações nervosas livres, localizadas na camada mais profunda da derme (estrato compacto), que realizam

também a transdução de sinais térmicos (STEVENS, 2004) e mecânicos (YAMASHITA e OGAWA, 1991).

3.3.2. Receptores Visuais

Quando se compara os olhos de peixes e anfíbios, observamos que este último, apresenta algumas alterações morfológicas vantajosas como, por exemplo, a presença de músculos de ajustamento ou adaptação visual, pálpebras de proteção, lente plana e localizada atrás da íris e presença de glândulas (DUELLMAN e TRUEB, 1994).

Vários estudos comportamentais e neurofisiológicos têm fornecido informações importantes a respeito da percepção visual em anuros e salamandras. Em um estudo, envolvendo 121 espécies de anuros, foi demonstrado que cada espécie tem uma intensidade de luz preferencial e uma iluminação ambiente ideal, sob a qual respondem fototropicamente. Os autores sugerem, também, que o comportamento fototrópico está associado a quatro mecanismos fisiológicos, que contribuem para as diversas respostas comportamentais frente às diferentes intensidades de luz e comprimentos de ondas, são eles: a presença de diferentes tipos de fotorreceptores, com níveis de absorção diferentes; o controle da quantidade de luz que chega a retina pela pupila; o controle da quantidade de luz que chega a célula receptora por meio da migração de pigmentos do epitélio; e a adaptação de claro e escuro por células fotorreceptoras (cones e bastonetes) (HAILMAN E JAEGER, 1976).

3.3.3. Receptores Sensoriais em Girinos

O sistema sensorial dos girinos abrange diversos mecanismos sensitivos, entre eles: visão, gustação, audição, funções vestibulares, mecanopercepção (via sistema linha lateral), além de: fotorrecepção (via complexo pineal) e somatossensações como: dor e sensação postural; temperatura e toque (LANNON, 1999).

3.3.3.1. Receptores da Linha Lateral

Em geral, o grau de desenvolvimento do sistema da linha lateral está ligado à dependência dos vertebrados aquáticos ao ambiente (WRIGHT, 1951), estando presente em ciclostomados, em peixes e, em alguns casos, em anfíbios, durante a fase larval ou, até mesmo durante a fase adulta, em espécies aquáticas (SHERWOOD *et al.*, 2005).

Em anamniotas aquáticos, o sistema da linha lateral consiste de órgãos terminais mecanoreceptores e eletroreceptores (BULLOCK *et al.*, 1983). Em anuros, mesmo durante a fase larval, o sistema da linha lateral é composto apenas por mecanoreceptores ou neuromastos (BUTLER e HODOS, 2005), sensíveis, principalmente, a deslocamentos da coluna de água (LANNON, 1999). Esse sistema, em girinos, consiste basicamente de três linhas principais (dorsal, mediana e ventral), que percorrem o tronco e a cauda, e duas na cabeça (UCHIYAMA *et al.*, 1991).

Os neuromastos localizados na linha dorsal são sensíveis a deslocamentos dorsoventrais, ao passo que, os localizados na linha mediana e ventral, a deslocamentos ântero-posteriores. Na cabeça, as linhas supra e infra-orbitais, que circulam os olhos e captam alterações tangenciais à sua margem, seguem em direção as narinas e formam a linha angular, responsável pela captação de alterações dorsoventrais, e as duas linhas do hióide (anterior oral e longitudinal oral), sensíveis a deslocamentos dorsoventrais e ântero-posteriores (LANNOO, 1987) (FIGURA 1).

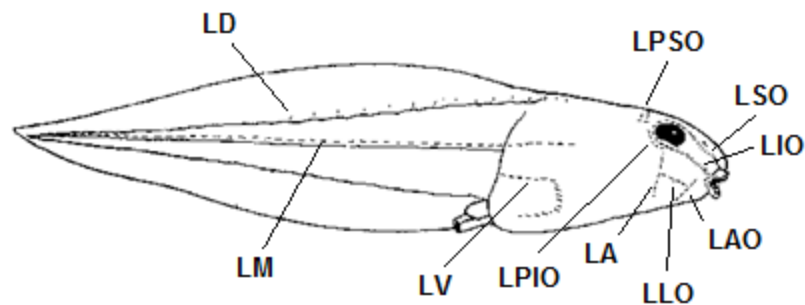


FIGURA 1 – Componentes do sistema de linha lateral de girinos. Abreviações: LA= linha anterior, LAO= linha anterior oral, LD= linha dorsal, LIO= linha infra-orbital, LLO= linha longitudinal oral, LM= linha mediana, LPIO= linha posterior infra-orbital, LPSO= linha posterior supra-orbital, LSO= linha supra-orbital, LV= linha ventral. Adaptação: LANNOO, 1999.

3.4. Bem-estar Animal

O bem-estar deve ser definido de forma a permitir a correlação com outros conceitos, como adaptação, sofrimento, dor, ansiedade, estresse, saúde, entre outros, essenciais para seres humanos, como liberdade, controle e felicidade (BROOM E MOLENTO, 2004).

Embora existam diversas definições propostas para o bem-estar animal, a mais aceita, no âmbito científico, foi publicada na década de 80, segundo a qual, bem-estar de um indivíduo é seu estado em relação às suas tentativas de se adaptar ao seu ambiente (BROOM, 1986).

Uma vez que, qualquer manejo inadequado, como: transporte, interações sociais, fome, traumatismos, mutilações variadas, procedimentos laboratoriais e, até mesmo, tratamento veterinário, podem afetar de forma negativa o bem-estar do animal, é quase impossível falar de bem-estar animal sem entrarmos em outro tópico, o estresse (ROSS e ROSS, 2008).

3.5. Definição de Estresse

O estresse e suas manifestações vêm recebendo uma atenção cada vez maior devido à morbidade e a mortalidade às quais estão associados (TAVARES *et al.*, 2000). Praticamente qualquer estímulo, seja natural ou antropocêntrico, infligido a um animal, causa não só alterações comportamentais como também fisiológicas. Todavia, as respostas a esses estímulos podem variar, de níveis normais, como aquelas observadas devido a modificações ambientais, a níveis considerados estressantes (GALHARDO e OLIVEIRA, 2006).

Estresse pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo de um animal é ameaçado ou interrompido pela ação de estímulos intrínsecos ou extrínsecos (CHROUSOS e GOLD, 1992). Brett (1958) apud Oba *et al.* (2009) definiram o estresse como um estado, resultante de alterações nas condições ambientais, que ameaçam a sobrevivência do animal.

Atualmente, a definição mais aceita é de que qualquer modificação que afete a nutrição, o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução, além de outros aspectos, bioquímicos e fisiológicos, ou seja, que afete a homeostase de um organismo é um agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

Em geral, a resposta a um estímulo estressante pode ser classificada em duas fases, a primeira ou fase inicial se caracteriza pela resposta ao agente estressor, seguida, então, pela fase de adaptação. Entretanto, dependendo da magnitude e da duração do estresse, pode-se observar uma terceira fase, a de exaustão, em que a saúde e, conseqüentemente, a vida do animal pode estar comprometida, uma vez que, pode levar à inibição do crescimento, à disfunções reprodutivas, à redução da resistência a patógenos e, dessa forma à uma redução da sobrevivência (SCHRECK *et al.*, 2001; FINSTAD *et al.*, 2003; PORTZ *et al.* 2006; ROSS e ROSS, 2008; IVERSEN *et al.*, 2009).

Uma vez que, em animais aquáticos, o estresse pode ser proveniente de várias fontes, das quais, a grande maioria, são práticas comuns, utilizadas no dia a dia, é quase impossível avaliar a fisiologia de um organismo aquático realmente sem estresse (ROSS e ROSS, 2008). Os agentes estressores podem ser resultantes dos sistemas de criação não apropriados, dos manejos inadequados (físico, profilático, sanitário e alimentar), das alterações ambientais (temperatura e luminosidade), de problemas com a qualidade física e química da água e da presença de outros animais e pessoas, assim como o transporte (ROCHA, 2007; IVERSEN e ELIASSEN, 2009; IVERSEN *et al.*, 2009). A operação de transporte é umas das mais importantes na aquicultura e tem recebido pouca atenção (GOMES, 2002), sendo que, o principal precursor do estresse é a abrasão mecânica, causada pelo inevitável contato entre os animais, principalmente, quando a densidade de

estocagem é elevada (ROSS e ROSS, 2008). Assim, procedimentos rotineiros em aquicultura podem ser uma fonte importante de estresse a muitas espécies (IVERSEN *et al.*, 1998; CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Em anfíbios, ainda são poucos os estudos com respeito aos mecanismos envolvidos na resposta fisiológica ao estresse, bem como as variações fisiológicas envolvidas. Um dos principais problemas enfrentados pela ranicultura, diz respeito a agentes patológicos, que podem ter como fonte primordial, o estresse (FERREIRA *et al.*, 2001).

3.5.1. Respostas Fisiológicas ao Estresse

Embora diversos hormônios estejam envolvidos na resposta fisiológica a um agente estressor, dois grupos se destacam: as catecolaminas e os glicocorticóides. A primeira, responsável pela resposta imediata ao agente estressor, fuga ou luta, e o segundo pela resposta ao longo prazo (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

Inúmeras respostas fisiológicas são ativadas pela ação das catecolaminas (por exemplo, epinefrina e a norepinefrina) com a redução da atividade visceral e digestiva, aumento da acuidade visual e do fluxo sanguíneo para o cérebro, aumento da frequência respiratória e da eficiência das trocas gasosa nos pulmões, vasodilatação nos músculos, vasoconstrição periférica e aumento da frequência cardíaca (ROMERO e BUTLER, 2007). As respostas fisiológicas auxiliam o animal a sobreviver a uma ameaça imediata, como o ataque de um predador ou competidor

co-específico, aumentando o alerta e provendo energia para os músculos (WINGFIELD *et al.*, 1998; SAPOLSKY, 2002; MCEWEN e WINGFIELD, 2010).

Os glicocorticóides são uma classe de hormônios estereóides e a elevação da taxa circulatória de cortisol é uma resposta clássica ao estresse, em peixes e na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e mamíferos marinhos, e a de corticosterona, em pássaros, répteis, anfíbios e alguns roedores (ROMERO e BUTLER, 2007). A ação dos glicocorticóides, em longo prazo, parece estar associada tanto à mobilização de energia dos músculos e aumento da concentração de ácidos graxos no plasma, como também, à redução de efeitos prejudiciais do estresse como redução do crescimento, aumento da incidência de doenças e diminuição da sobrevivência (PAOLUCCI *et al.*, 1990; ZERANI *et al.*, 1991; HARBUZ e LIGHTMAN, 1992; CODDINGTON e CREE, 1995; WENDELAAR BONGA, 1997; EINARSDOTTIR *et al.*, 2000a; EINARSDOTTIR *et al.*, 2000b; SCHRECK *et al.*, 2001; BARTON, 2002; WINGFIELD e SAPOLSKY, 2003; FINSTAD *et al.*, 2003; MOORE e JESSOP, 2003; PORTZ *et al.*, 2006; HASAN e BART, 2007; MARTIN, 2009).

De acordo com Gomes *et al.* (2003) e Sumpter (1993) apud Rocha (2007), os níveis plasmáticos de glicose, liberado pela ação das catecolaminas e de glicocorticóides, são bons marcadores biológicos para a avaliação do estresse (SAPOLSKY *et al.*, 2000; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; ROTHWELL *et al.*, 2005). Paolucci *et al.* (1990) ao avaliarem o efeito do estresse agudo, causado pela captura, sobre a concentração plasmática de corticosterona em fêmeas vitelogênicas de *Rana esculenta*, relataram que após cinco minutos de captura a concentração plasmática desse glicocorticóide dobrava. Valores semelhantes foram relatados por Zerani *et al.* (1991), após avaliar o efeito do estresse em fêmeas da

mesma espécie, e por Licht *et al.* (1983), após analisar a concentração plasmática de corticosterona, em fêmeas vitelogênicas de *Rana catesbeiana*. Coddington e Cree (1995) relataram valores bem inferiores para fêmeas de *L. ewingi* (<1,8 ng/ml). Segundo os autores, essa baixa concentração plasmática pode ter ocorrido devido à ação do uso de MS-222, na tentativa de diminuir a “luta” do animal durante a coleta de sangue, e afirmaram que o uso do anestésico pode ter resultado na redução do estresse e, conseqüentemente, no pequeno aumento de corticosterona no plasma.

3.5.2. Respostas Neuroendócrinas ao Estresse

A resposta neuroendócrina ao estresse em peixes é semelhante à dos mamíferos e são mediados pelo sistema adrenérgico e pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (WENDELAAR BONGA, 1997; CHANDROO *et al.*, 2004; HUNTINGFORD *et al.*, 2006; ROSS e ROSS, 2008), assim como em anfíbios (GLENNEMEIER e DENVER, 2002b).

A percepção de um agente estressor inicia-se com uma rápida liberação de catecolaminas pelos tecidos cromafins, homólogo à medula adrenal em mamíferos, que por sua vez induzem rapidamente ao aumento da glicose no sangue, inicialmente, pela via glicogenolítica (PERRY E BERNIER, 1999; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; ROTHWELL *et al.*, 2005). Em seguida, o hipotálamo disponibiliza o hormônio liberador de corticotropina que, juntamente com a arginina vasopressina, promovem a liberação do hormônio adrenocorticotrófico pela pituitária e, conseqüentemente, a síntese e a secreção de glicocorticóides pelo tecido interrenal, homólogo ao córtex adrenal em mamíferos (HUNTINGFORD *et al.*, 2006).

O controle da liberação de glicocorticóides é realizado principalmente por meio de *feedback* negativo, mas também possui outras formas de regulação tais como: ciclo circadiano (diários), ultracircadianos (dentro de um mesmo dia), variação sazonal, etapas de desenvolvimento (fetal, neonatal e puberal) e estresse (VOET *et al.*, 2000; GUYTON e HALL, 2002; HICKMAN *et al.*, 2003).

Ao contrário das catecolaminas, cuja resposta ao agente estressor ocorre em questão de segundos, a resposta dos glicocorticóides é lenta (GERWICK *et al.*, 1999; ROMERO e BUTLER, 2007), cerca de 3 a 5 minutos, mas dependendo da espécie esse tempo pode ser maior (ROMERO e BUTLER, 2007). Assim, com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal inicia-se um somatório de alterações comportamentais e/ou fisiológicas, responsáveis pela eliminação ou redução do potencial impacto do agente estressor, aumentando assim, a sobrevivência do animal (DENVER, 1997; DENVER, 1998; MOORE e JESSOP *et al.*, 2002, GLENNEMEIER e DENVER, 2002a; MOORE e JESSOP, 2003). Todavia, as alterações comportamentais dependem do tipo de agente estressor sendo de difícil predição (ROMERO e BUTLER, 2007).

3.6. Dor e Nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descritas em termos deste dano.

De acordo como o Artigo 2º, do Capítulo II, da Resolução Nº 879, de 15 de Fevereiro de 2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, “Qualquer procedimento que cause dor no ser humano causará dor em outras espécies de vertebrados, tendo em vista que os animais são seres sencientes, experimentam dor, prazer, felicidade, medo, frustração e ansiedade”. Entretanto, o tema: “percepção da dor em animais não mamíferos” é muito controverso.

Nos seres humanos, o neocórtex (encontrado somente em mamíferos) é uma parte importante do mecanismo neural, responsável pela experiência subjetiva do sofrimento. Baseado nessa informação, muitos autores afirmam que, os peixes e os demais animais, não pertencentes à classe Mammalia, são incapazes de sentir dor ou sofrimento (ROSE, 2002; STEVENS, 2004; HUNTINGFORD *et al.*, 2006). A palavra dor se refere a complexas experiências perceptuais e emocionais, em humanos, sendo um conceito extremamente subjetivo (IASP Subcommittee on Taxonomy, 1986) e desse modo, aplicado inadequadamente em seres não humanos. Do ponto de vista desses autores, a dor é uma visão totalmente antropocêntrica e irreal, sendo o termo mais adequado para esses animais a nocicepção. Nocicepção é a detecção de um estímulo, potencialmente prejudicial, pelos nociceptores ou vias nociceptivas, acompanhada de um reflexo de retirada, afastando-se da fonte de estímulo (SNEDDON, 2004).

A ausência de neocórtex em vertebrados não mamíferos foi também relatada por Hastein *et al.* (2004). Entretanto, segundo os autores a capacidade cognitiva necessária para senciência, auto preservação e percepção da dor não podem ser inferidos apenas pela neuroanatomia. Ross (2008) reforça ainda que, qualquer procedimento, que envolva a captura e/ou manipulação de animais aquáticos, pode causar dor, em algum grau, razão pela qual, medidas que proporcionem alívio a

esse sofrimento devem ser tomadas, visando sempre o bem-estar do indivíduo. Além disso, evidências crescentes sugerem que todos os animais aquáticos podem experimentar um estado psicológico negativo, análogo à dor humana, em resposta a estímulos nocivos (SMITH *et al.*, 2007).

Em anfíbios, os terminais nervosos responsáveis pela transdução do estímulo nocivo (nociceptores) são formados por fibras aferentes mielínicas e amielínicas, classificadas de acordo com a morfologia, velocidade de condução do impulso nervoso, latência e potencial de resposta, em: tipo A (fibras de grande diâmetro e bastante mielinizadas), tipo B (fibras mais finas e pouco mielinizadas) e tipo C (fibras amielínicas), cujas características tem grandes semelhanças com as fibras aferentes, A β , A δ e C, respectivamente, encontradas no sistema sensorial de mamíferos (LYNN, 1994; STEVENS e WILLENBRING, 1997). Outra semelhança encontrada no mecanismo nociceptivo de anfíbios e mamíferos é a presença de neurotransmissores como: substância P, calcitonina e glutamato, além de metil-encefalinas e sítios receptores de opióides, importantes na percepção da dor (INAGAKI, *et al.*, 1981; LOREZ e KEMALI, 1981; STEVENS, 1988; STEVENS e PAUL, 1996, NEWMAN *et al.*, 2002, SNEDDON, 2004).

Assim, diversos estudos demonstram que a via nociceptiva de anfíbios é, estruturalmente e funcionalmente, similar ao dos mamíferos, embora talvez um pouco mais primitiva (WILLENBRING e STEVENS, 1996; WILLENBRING e STEVENS, 1997; HANAMOTO E SIMONE, 2003; STEVENS, 2004).

A sedação, a analgesia e a anestesia são ferramentas que podem contribuir para o conforto e bem-estar animal durante o manejo e o transporte, além de atender a uma das exigências da Resolução Nº 879/2008 do Conselho Federal de

Medicina Veterinária, segundo a qual, durante os procedimentos didáticos e científicos, deve ser evitando a ocorrência de dor e minimizado o estresse e o desconforto dos animais (Art. 6º, § 3º).

3.7. Sedação, Analgesia e Anestesia

3.7.1. Definição

A anestesia foi definida inicialmente por Bailey (1721) como “defeito da sensação” e posteriormente, na Enciclopédia Britânica (1771) como “privação dos sentidos” (MORGAN Jr. *et al.*, 2006). Ross e Ross (2008) definiram anestesia como perda de sensibilidade ou insensibilização, e a sedação, como um efeito calmante, um estágio preliminar à anestesia, em que a sonolência é induzida, com o entorpecimento da percepção sensorial e, talvez, com alguma analgesia (insensibilidade à dor) ou antinocicepção, mas sem que haja perda total da percepção sensorial ou do equilíbrio.

3.7.2. Técnicas de Indução à Anestesia

Dependendo da espécie, a sedação e a anestesia podem ser induzidas por uma ampla variedade de técnicas, entre elas físicas, como hipotermia, estímulo elétrico, pressão local e acupuntura; químicas (inalação, aspersão, imersão ou aplicação de drogas químicas) e psicológicas, como a hipnose. A eficácia real de

alguns desses métodos para animais peclotérmicos ainda é duvidosa (ROSS e ROSS, 2008).

Embora a indução à anestesia por meio da hipotermia, em mamíferos, seja relatada por diversos autores (de JONG *et al.*,1966; ROSSI e BRITT, 1984; ANTOGNINI, 1993; GUERIT, 1994), inclusive em humanos (de JONG *et al.*,1966; GUERIT, 1994), em animais ectotérmicos, o uso dessa técnica, objetivando anestesia e/ou analgesia, permanece em discussão. Aparentemente, apesar da diminuição da temperatura levar a redução do metabolismo geral e imobilização do animal, a anestesia parece não ser alcançada, assim como qualquer analgesia (ROSS e ROSS, 2008), de modo que a hipotermia deve ser limitada a procedimentos não dolorosos (MARTIN, 1995) ou associada a outras técnicas anestésicas (ROSS e ROSS, 2008).

Assim, em animais peclotérmicos, as técnicas mais utilizadas, atualmente, para indução à anestesia, são realizadas por meio de inalação, imersão, aspersão ou aplicação de substâncias anestésicas (CAKIR *et al.*, 2005; HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2005; GUENETTE *et al.*, 2007; CECALA *et al.*, 2007; BARTER *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; ANTUNES *et al.*, 2008).

3.7.3. Características Desejáveis de um Composto Anestésico

Embora existam diversas técnicas para indução à anestesia, algumas propriedades, necessárias a um agente anestésico, são comuns a todos os métodos de uso corrente como facilidade de administração, eficácia a baixas dosagens e/ou exposição, boa analgesia, rápida indução ao estado desejado e facilidade de

manutenção, fácil reversão, grande margem de segurança e baixo custo, além de rápida excreção ou metabolização e ausência de resíduos (MARKING e MEYER, 1985, PIRHONEN e SCHERECK, 2003; ROSS e ROSS, 2008).

3.8. Anestésicos Locais

Anestésicos locais diferem dos anestésicos gerais por sua ação regional, modo de aplicação e, principalmente, sobre o local de atuação. Os anestésicos locais atuam sobre os axônios enquanto os anestésicos gerais atuam sobre as transmissões sinápticas (STOELTING e MILLER, 2004; MORGAN Jr. *et al.* 2006).

Os anestésicos locais compreendem um grande número de moléculas de diferentes estruturas químicas como os amino-ésteres, as amino-amidas, as amido-acetonas, as amidas, os alcoóis, os tio-ésteres, as tio-amidas, os derivados de uréia, os poliésteres (GUPTA, 1991), os derivados de monoterpenos do carano (LOCHYNSKI *et al.*, 2002). Em geral, os anestésicos locais consistem em um anel aromático insaturado separado de uma amina terciária por uma cadeia intermediária, um éster ou uma amida. A amina terciária aceita prótons e confere o caráter hidrofílico à molécula que, quando protonada, pode ser ionizada para competir com o canal de sódio em seu canal protéico. O anel aromático imprime o caráter lipofílico e está diretamente relacionado à difusibilidade das moléculas do anestésico pelas barreiras orgânicas (DELFINO e VALE, 2001).

Os anestésicos locais, quando em contato com as membranas nervosas, provocam bloqueio reversível da condução de impulsos nervosos. Aumentos na concentração levam a interrupção da transmissão de impulsos neurais autônomos,

sensoriais e motores, que resultam em bloqueio do sistema nervoso autônomo, anestesia sensorial e paralisia dos músculos esqueléticos nas áreas inervadas pelos nervos afetados (STOELTING e MILLER, 2004).

Uma vez que, a lipossolubilidade tem relação direta com a potência do anestésico; o grau de ligação protéica influencia o tempo de ação; o grau de ionização guarda relação inversa com a velocidade de ação e a estereoisomeria relaciona-se com a potência e toxicidade (CARVALHO, 1994; DELFINO e VALE, 2001), a farmacologia dos anestésicos locais depende de substituições no anel aromático, do tipo de ligação na cadeia intermediária e dos grupos alquil presos ao nitrogênio da amina (MORGAN Jr. *et al.*, 2006).

3.8.2. Mecanismo de Ação

As teorias propostas para explicar o mecanismo de ação dos anestésicos locais podem ser categorizadas em duas vertentes. A primeira atribui o efeito anestésico, dos diferentes compostos, à ligação destes à proteína canal de sódio (de PAULA e SCHREIER, 1996).

Trabalhos pioneiros demonstraram o efeito direto dos anestésicos sobre os canais de sódio e que a interação, anestésico X canal de sódio, ocorria com diferentes graus de afinidade, dependendo do estado funcional (ativado, inativado ou repouso) dessa proteína. Teorizou-se, então, que as diferentes afinidades seriam devido à existência das formas ionizada e neutra dos anestésicos, em pH fisiológico (HODGKIN e HUXLEY, 1952).

Estudos a partir do final da década de 60 apontaram que a forma carregada dos anestésicos locais seria a responsável pelo efeito anestésico e que, o sítio de ligação seria acessível apenas pela face citoplasmática da membrana (NARAHASHI e YAMADA, 1969; FRAZIER *et al.*, 1970). Todavia, a eficácia anestésica de compostos que não se protonam em pH fisiológico, como a benzocaína e seu análogos, não encontrava respaldo nessa teoria de sítio único para os anestésico protonados (PINTO *et al.*, 2000).

A segunda teoria, idealizada na década de 70 e a mais aceita até os dias atuais, é dada pela hipótese da afinidade modulada pelo receptor, que admite a existência de um ou mais sítios receptores para os anestésicos locais no canal de sódio, de modo que, as diferentes afinidades desses compostos pelo sítio, ou pelos sítios, seriam determinadas pelo estado conformacional do canal, sendo maior a afinidade pelo estado inativo ou em repouso que pelo estado aberto (HILLE, 1977; HONDEGHEM e KATZUNG, 1977).

A segunda vertente (hipótese do lipídio) considera a interação dos anestésicos locais com os componentes lipídicos da membrana, que levariam a alterações estruturais e dinâmicas, como: expansão da área superficial de monocamadas e de bicamadas (SKOU, 1954 apud FRACETO e de Paula, 2006), bem como sua separação lateral (GALLOVA e BALGAVY, 1997) e aumento de fluidez (BIANCONI e SCHREIER, 1991), que resultariam em alterações conformacionais no canal de sódio e, conseqüentemente, no fechamento dos canais de sódio, inativando-os (LEE, 1976; de PAULA e SCHREIER, 1996).

3.8.2. Metabolismo e Excreção

O metabolismo e a excreção dos anestésicos locais diferem de acordo com a sua estrutura (FERNANDES e ISMAEL, 2007)

Os compostos mais utilizados clinicamente são aqueles derivados de ésteres (cocaína, procaína e benzocaína) e amidas (bupivacaína, dibucaína e lidocaína). Os do tipo éster são metabolizados pela pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática e a hidrólise é bastante rápida, sendo os metabólitos solúveis excretados na urina. Em locais onde não existem enzimas esterases (líquido cefalorraquidiano) a excreção do anestésico depende da absorção do composto pela corrente sanguínea (MORGAN Jr. *et al.*, 2006).

Os anestésicos do tipo amida, menos potentes e com menor toxicidade, são metabolizados por enzimas microssomais no fígado, via citocromo P450 (CAGNOLATI *et al.*, 2007; FERNANDES e ISMAEL, 2007). A taxa de metabolismo depende do agente utilizado, porém, é mais lenta do que a hidrólise dos ésteres, o que confere uma meia vida plasmática mais longa às amino-amidas (MORGAN Jr. *et al.*, 2006).

3.9. PRINCIPAIS COMPOSTOS OU AGENTES ANESTÉSICOS UTILIZADOS EM ANIMAIS PECILOTÉRMICOS

Dependendo da técnica empregada para a indução anestésica, existem diferentes tipos de drogas e/ou compostos que podem ser utilizados. Entre os agentes anestésicos, frequentemente, empregados na imersão encontram-se o MS-

222 (tricaína metanosulfonato), benzocaína, quinaldina, 2-fenoxietanol, metomidato, etomidato, mentol, eugenol e AQUI-S[®].

Maiores detalhes dos compostos anestésicos utilizados no presente estudo, com respeito aos mecanismos de ação, presença de receptores específicos, acúmulo e eliminação no sangue e nos tecidos, em peixes, são descritos a seguir.

3.9.1. Benzocaína

Composto obtido a partir da esterificação do ácido p-aminobenzóico, muito semelhante estruturalmente ao MS-222 (tricaína metanosulfonato), único anestésico aprovado nos Estados Unidos da América pela FDA (Food and Drug Administration) para o uso na aquicultura, visando a redução de estresse, injúrias e mortalidade durante as práticas de manejo e transporte (MEINERTZ *et al.*, 1996). Todavia, é exigido um período de depuração dessa droga de 21 dias para o consumo humano (MEINERTZ e SCHREIER, 2009).

A benzocaína, um anestésico local em mamíferos e um eficiente anestésico geral, em peixes (STEHLY *et al.*, 2000), é inodoro, insípido e de baixa solubilidade em água (ALLEN *et al.*, 1994). Possui tempo de indução e recuperação rápida (MEINERTZ *et al.*, 1999), além de boa margem de segurança (IVERSEN *et al.*, 2003; ROSS e ROSS, 2008), embora, em altas temperaturas, esse valor pareça diminuir (ROSS e ROSS, 2008). Por ser uma substância solúvel em gordura, o tempo de recuperação pode ser maior em animais mais velhos, com maior acúmulo de gordura e/ou prenhes (ROSS e ROSS, 2008).

As principais vantagens relatadas a respeito desse composto são: o baixo custo e a facilidade de obtenção (ROUBACH e GOMES, 2001). Mas, do ponto de vista ecológico, a benzocaína trás uma terceira grande vantagem, a possibilidade de ser removida por meio de filtragem por carvão ativado, não deixando resíduos no meio ambiente (HOWE *et al.*, 1990; ROUBACH e GOMES, 2001).

3.9.1.1. Acúmulo e Eliminação

Embora a literatura com relação à eficácia do uso da benzocaína como um anestésico para peixes seja vasta, pouco se sabe a respeito das propriedades farmacocinéticas desse composto (MATTSON e RIPLE, 1989; GOMES *et al.*, 2001; IVERSEN *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 2004; DELBON, 2006; GIMBO *et al.*, 2008; OKAMOTO *et al.*, 2009; KIESSLING *et al.*, 2009).

Em estudos avaliando a metabolização e persistência da benzocaína em peixes observou-se a formação três metabólitos: ácido *p*-aminobenzóico, ácido acetil-*p*-aminobenzóico e acetilbenzocaína, com diferentes tempos de eliminação (MEINERTZ *et al.*, 1991; HAYTON *et al.*, 1996; SZOKE *et al.*, 1997). A benzocaína e a acetilbenzocaína são eliminados mais rapidamente, por meio das brânquias enquanto que os ácidos, *p*-aminobenzóico e acetil-*p*-aminobenzóico, são eliminados, inicialmente na urina, a taxas menores (MEINERTZ *et al.*, 1996).

Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), observou-se que após 3 minutos, da aplicação intrarterial de 20,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ^{14}C -benzocaína HCl, o principal resíduo eliminado na água foi de benzocaína e, após 60 minutos, acetilbenzocaína. Na urina,

o ácido acetil-p-aminobenzóico foi o principal metabólito encontrado, após 1, 8 e 20 horas pós aplicação, embora vestígios de benzocaína, ácido *p*-aminobenzóico e acetilbenzocaína tenham, também, sido encontrados (MEINERTZ *et al.*, 1991).

3.9.1.1.1. Plasma

Stehly *et al.* (1998) ao avaliarem a farmacocinética da benzocaína em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mantidos em imersão, relataram um volume de distribuição de $2,369 \pm 0,678 \text{ L kg}^{-1}$ a $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e de $3,260 \pm 1,182 \text{ L kg}^{-1}$ a $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que Meinertz *et al.* (1996) ao analisarem a mesma espécie informaram valores iguais a $0,112 \text{ L kg}^{-1}$ e $0,156 \text{ L kg}^{-1}$ após administração intrarterial de 6 mg/kg e 9 mg/kg do anestésico, respectivamente. Um indicativo de que a via de administração da droga tem grande influência sobre a distribuição do fármaco mg/kg (KIESSLING *et al.*, 2009).

A meia-vida de eliminação da benzocaína no plasma em trutas, relatado por Meinertz *et al.* (1996), de 15,8 minutos (após aplicação de 9 mg/kg de benzocaína) foi semelhante ao observado em salmões *Salmo salar*, cujo valor relatado foi de 18,7 minutos (KIESSLING *et al.*, 2009). Entretanto, valores bem diferentes foram relatados por Stehly *et al.* (1998), $60,8 \pm 30,3$ minutos e $35,9 \pm 13,0$ minutos, em trutas aclimatadas a 6 e 12°C , respectivamente.

3.9.1.1.2. Tecidos

Allen (1988), avaliando a deposição nos tecidos de benzocaína, em truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e em “largemouth bass” (*Micropterus salmoides*), após 15 minutos de exposição ao anestésico (50 mg/L de benzocaína), encontrou valores iguais a $14,0 \mu\text{g g}^{-1}$ em truta arco-íris e $10,6 \mu\text{g g}^{-1}$ em “largemouth bass”. Após um período de eliminação de 4 e 8 horas, para trutas e “largemouth bass”, respectivamente, a quantidade de resíduos, nos tecidos, caiu para níveis abaixo do detectável ($0,5$ a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$).

Em “catfish” (*Ictalurus punctatus*), após imersão em 70mg/L, por 5 minutos, seguido de 30 minutos de exposição em 35mg/L em ^{14}C -benzocaína, os autores encontraram uma maior deposição de resíduos, após 10 dias, na bile, seguido por fígado, rins, pele e músculo vermelho, plasma e músculo branco. A meia-vida da benzocaína nos tecidos e fluídos foi de, aproximadamente, 8 dias (HAYTON *et al.*, 1996).

Stehly *et al.* (2000), ao avaliarem a eliminação da benzocaína em filés de tecidos comestíveis de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) a 7 e 16°C efeito da temperatura, relataram um período de eliminação da droga de 24 horas, independente da temperatura. Após esse período, as concentrações de benzocaína, em todas as amostras avaliadas, caíram para valores abaixo do limite de quantificação.

3.9.2. Eugenol

Composto anestésico obtido pela destilação das flores, talos e folhas da *Syzygium aromaticum* (*Eugenia aromaticum*) ou *Eugenia caryophyllata* cujo princípio

ativo, o eugenol, tem propriedades anti-inflamatórias e bactericidas, além de: anticancerígena, anti-isquêmica, anti-histamínica e anti-anafilática (LAEKEMAN *et al.*, 1990; ATSUSANE, 1991; REDDY e LOKESH, 1994; NISHIJIMA *et al.*, 1998; JADHAV, *et al.*, 2004). Além disso, o eugenol é, também, um potente depressor do Sistema Nervoso Central (ANDERSON *et al.* 1997; ROSS e ROSS, 2008).

Para fins alimentares, o óleo de cravo é classificado como uma substância segura quando administrada em quantidades inferiores a 1500 ppm, em todas as categorias (FISHER *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1997; WATERSTRAT, 1999). Além disso, a FAO (Food and Agriculture Organization) e a WHO (World Health Organization) determinam como aceitável a ingestão diária de 2,5 mg de eugenol por kg de peso vivo, em humanos (FISHER e DENGLER, 1990; NAGABABU e LAKSHMAIAH, 1992; ANDERSON *et al.* 1997).

3.9.2.2. Mecanismo de Ação

Frequentemente utilizado para indução analgésica em intervenções odontológicas, o exato mecanismo de ação do eugenol ainda não foi esclarecido (OHKUBO e KITAMURA, 1997). Estudos *in vitro*, demonstraram a interação positiva, entre o eugenol e o receptor vanilóide subtipo 1 (VR1), inibindo a transmissão da dor pelo bloqueio desse receptor (YANG *et al.*, 2003). O VR1 é um canal catiônico, não seletivo, que participa da transdução periférica da dor química e física, incluindo estímulos nocivos térmicos e de baixo pH (GUENETTE *et al.*, 2007c). O eugenol parece interagir também com neurotransmissores importantes na transmissão da dor, como o GABA (ácido gama-aminobutírico) e o glutamato (AOSHIMA e

HANAMOTO, 1999; YANG et al., 2003). No GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC, o eugenol exerce efeito agonista, levando a depressão do SNC e anestesia (GUENETTE *et al.*, 2007c), enquanto que, no glutamato, mais especificamente, no receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), relacionado com entrada de íons cálcio na célula, o eugenol exerce efeito antagonista, interferindo na sensibilidade a dor (WIE *et al.*, 1997; AOSHIMA e HANAMOTO, 1999).

3.9.2.2. Acúmulo e Eliminação

3.9.2.2.1 Plasma

Guennette *et al.* (2006) ao avaliarem a atividade farmacocinética do eugenol, em ratos de laboratório (Sprague-Dawley), após a aplicação na jugular de 20 mg/kg do composto, relataram uma meia-vida no plasma e no sangue de 7,05 e 12,6 minutos, respectivamente, resultados inferiores aos relatados por Guennette *et al.* (2007a), em que a meia-vida de eliminação do eugenol no plasma foi de 14 horas e no sangue de 18,3 horas, o que, segundo os autores, sugere uma possível acumulação da droga após administrações consecutivas. De acordo com os autores, o período necessário para a eliminação total da droga em ratos é aproximadamente 128 horas, uma vez que, a taxa de eliminação ou “clearance” encontrado foi de 86,8 L/h/kg.

Em truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), a avaliação de amostras de sangue coletadas em diferentes períodos pós indução anestésica revelaram uma rápida redução (acima de 50%) na concentração de eugenol no sangue, na primeira

hora e uma meia-vida de eliminação da droga de 12,14 horas (GUENETTE *et al.*, 2007c).

Uma vez que, estudos visando à redução do estresse em anfíbios são recentes, ainda existem poucos relatos a respeito do possível acúmulo de compostos anestésicos no sangue ou nos tecidos, assim como, do tempo necessário para a eliminação total da droga nestes animais. Em um dos poucos trabalhos encontrados, com relação à avaliação farmacocinética de anestésicos em anuros, os autores, após análise de amostras de sangue, coletadas pós administração de eugenol, em *Xenopus laevis*, relataram um meia-vida de eliminação da droga de 4 horas (GUENETTE *et al.*, 2007b).

Em todas as espécies citadas, os autores reportaram uma possível acumulação do eugenol após administrações sucessivas, de modo que, o período de carência de 28 horas para rãs, 85 horas para trutas e 128 horas para ratos, deve ser respeitada para completa eliminação da droga (GUENETTE *et al.*, 2007c).

3.9.2.2.2 Tecidos

Em estudos visando à redução do estresse com o uso de eugenol, em *Macrobrachium rosenbergii* (SAYDMOHAMMED e KUMAR PAL, 2009), os autores relataram um acúmulo nos tecidos de 35,2 mg kg⁻¹ de eugenol, logo após o tratamento anestésico e, após períodos de depuração de 12, 24 e 48 horas, os níveis teciduais de eugenol caíram para 12 mg kg⁻¹, nas primeiras 12 horas, e para níveis indetectáveis nos períodos seguintes. Resultados semelhantes foram encontrados em perca prateada (*Bidyanus bidyanus*) (KILDEA *et al.*, 2004). Os

autores, ao avaliarem a acumulação e eliminação do eugenol nos tecidos, observaram que após uma exposição inicial, o acúmulo do composto foi inferior 5 mg kg⁻¹ e que, após 48 horas de depuração, nenhum resíduo do anestésico foi detectado. Segundo os autores, o uso frequente de óleo de cravo pode levar a redução da capacidade dos animais em eliminar completamente os resíduos dos tecidos.

3.9.3. Mentol

O mentol (5-metil-2-Isopropil-ciclohexanol), um composto orgânico, obtido em geral a partir da extração do óleo essencial da folha da menta (*Mentha arvensis* ou *Mentha piperita*) pode também, ser extraído ou sintetizado a partir de outros óleos essenciais como, por exemplo, do óleo essencial de citronela e de eucalipto. Por possuir três átomos de carbono assimétricos, o mentol possui quatro pares de isômeros ópticos denominados (+)- e (-)- mentol; (+)- e (-)- neomentol; (+)- e (-)- isomentol; (+)- e (-)- neoisomentol. Dentre eles, o mais comum na natureza é (-)-mentol que possui propriedades peculiares, responsáveis pelo odor e sabor característico de menta, e por isso muito utilizado como matéria-prima, não só em produtos alimentícios (aromatização de balas, bolos, bebidas, entre outros) como também, na linha de cosméticos (creme dental, exagatórios bucais, cremes de barbear etc.) e, principalmente farmacêuticos, devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antibacteriana, analgésicas e anestésicas (TIRILLINI *et al.*, 1996; ECCLES, 2000; OLSEN, 2000; UMEZU *et al.*, 2001; GALEOTTI *et al.*, 2001; GALEOTTI *et al.*, 2002).

3.9.3.1. Mecanismo de Ação

No primeiro relato fundamentado de que o mentol poderia produzir analgésia, foi constatado que a aplicação de mentol na mucosa oral provocava inicialmente irritação, mas, após exposições sucessivas, essa sensação reduzia devido à dessensibilização das fibras nociceptivas (CLIFF e GREEN, 1994).

Posteriormente, ao avaliar o efeito analgésico ou antinociceptivo do (-)-mentol e do (+)-mentol, constatou-se que apenas o isômero (-)-mentol possuía propriedades analgésicas e que, essas propriedades, eram resultantes da ativação de receptores kappa opióides (GALEOTTI *et al.*, 2002). Porém, postula-se que a ação analgésica do mentol seja via ativação do TRPM8, receptor para frio (VIANA *et al.*, 2002; JORDT *et al.*, 2003), induzindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e estimulando a neurotransmissão das sinapses sensoriais (TSUZUKI *et al.*, 2004; McKEMY, 2005). Outra via de ação ocorre pela inibição do sensor de dor TRPA1 (HARRIS, 2006). Ambos pertencentes à família dos receptores potenciais transientes, responsáveis pela sensação de estímulos físicos e químicos (luz, forças mecânicas, calor, odor, feromônios, pH, osmolaridade e estresse metabólico) (MINKE e COOK, 2002).

Além de propriedades analgésicas, o mentol, quando administrado topicamente possui efeito anestésico, provavelmente devido ao bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes do SNC (HAESELER *et al.*, 2002). Estudos subsequentes demonstraram que o mentol age como um potente modulador alostérico de receptores GABA_A e glicina (HALL *et al.*, 2004; WATT *et al.*, 2008), os principais alvos de agentes sedativos, ansiolíticos e anestésicos (FRANKS e LIEB,

1994; KRASOWSKI e HARRISON, 1999), uma vez que, esses receptores atuam na rápida inibição da neurotransmissão do SNC. Assim, a modulação desses receptores pode influenciar significativamente a atividade neuronal e, conseqüentemente, produzir sedação ou anestesia.

3.9.3.1. Acúmulo e Eliminação

O mentol é amplamente utilizado na anestesia de invertebrados marinhos (RUPPERT e BARNES, 1996) como, por exemplo, ostras (NORTON et al. 1996; MAMANGKEY et al., 2009) e camarões, sendo que para este último, foi relatado um período de depuração, para eliminação de qualquer resíduo de mentol nos tecidos, de 12 horas (SAYMOHAMMED e PAL, 2009). Porém, em animais superiores pecilotérmicos, ainda existem poucas informações a respeito do uso desta substância, sendo encontrando na literatura apenas informações relativas à eficácia do uso desse composto na indução anestésica, por exemplo, em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) (GONÇALVES et al., 2008), em tambaquis (*Colossoma macropomum*) (FAÇANHA e GOMES, 2005) e em tilápias (*Oreochromis niloticus*) (SIMÕES e GOMES, 2009). Deste modo, possíveis acúmulos teciduais e o período de carência, necessário para eliminação de qualquer resíduo, ainda não são conhecidos. Assim, maiores estudos são necessários para avaliação correta, quanto à eficiência e segurança, desse anestésico. A FAO e a WHO, classificam como seguro a ingestão diária de 0,20 mg kg⁻¹ de mentol (FISHER e DENGLER, 1990; NAGABABU e LAKSHMAIAH, 1992).

3.10. ESTÁGIOS DE ANESTESIA

Em peixes, a primeira descrição dos estágios de indução à anestesia foi adaptada por McFarland (1959), sofrendo algumas modificações ao longo dos anos, mas sem grandes alterações. Uma descrição dos estágios de anestesia e da resposta comportamental apresentada pelos peixes, mediante a indução anestésica (TABELA 1), foi apresentada por Bowser (2001), adaptada de Summerfelt e Smith (1990).

TABELA 1 – Identificação dos estágios de anestesia e descrição da resposta comportamental, em peixes

Estágios	Descrição	Resposta comportamental
0	Normal	Reação reflexa normal a estímulos; Frequência opercular normal; Tônus muscular normal;
1	Sedação leve	Reação reflexa a estímulos reduzida; Frequência opercular reduzida; Equilíbrio normal;
2	Sedação profunda	Ausência de resposta a estímulos externos leves; Redução da frequência opercular; Equilíbrio normal;
3	Perda parcial do equilíbrio	Perda parcial do tônus muscular; Nado errático; Aumento da frequência opercular; Reação apenas a estímulos táteis ou vibratórios fortes;
4	Perda total do equilíbrio	Perda total do tônus muscular e equilíbrio; Frequência opercular lenta e regular; Perda dos reflexos espinhais;

5	Perda da reação reflexa	Perda de todos os reflexos; Movimentos operculares lentos e irregulares; Frequência cardíaca lenta;
6	Colapso medular	Ausência de movimentos operculares; Provável parada cardíaca;

Fonte: BOWSER, 2001.

Com relação a anfíbios, até o momento, não foi observado uma descrição clara dos estágios de indução à anestesia e da resposta comportamental apresentada, sendo relatado apenas que a indução leva à redução dos movimentos gulares e dos reflexos de retirada; a anestesia leve, à ausência de reflexo de fuga e respiração abdominal; e a anestesia cirúrgica, à ausência do reflexo de retirada e dos movimentos gulares (Amphibian Anesthesia Guidelines, 2008).

3.10.1. Fatores que Afetam a Resposta Anestésica

Existem diversos fatores, além das diferentes rotas de administração da droga (LAFORTUNE *et al.*, 2001), classificados em bióticos e abióticos, que podem alterar ou mediar os processos anestésicos, interferindo na sua eficácia (ROSS e ROSS, 2008). Dentre os fatores bióticos podemos citar: a espécie (variabilidade inter e intra-específicas), tamanho e/ou peso (variabilidade fisiológica), sexo e maturidade sexual (diferenças na produção de enzimas), estágio reprodutivo (animais pós-desova), condição corporal (reserva de gordura), estresse (cansaço e exaustão) e sanidade (animais doentes, enfraquecidos) (HALL *et al.*, 2001; ZAHL *et al.*, 2009; HOSKONEN e PIRHONEN, 2004; TSANTILAS *et al.*, 2006). Com relação aos fatores abióticos

podemos citar a temperatura, salinidade, ph, pKa, temperatura da água e lipossolubilidade (HOSKONEN e PIRHONEN, 2004; KILDEA *et al.*, 2004; MYLONAS *et al.*, 2005; MEINERTZ *et al.*, 2006; FERNADES e ISMAEL, 2007; ROSS e ROSS, 2008).

3.11. USO DE ANESTÉSICOS EM ANFÍBIOS

Estudos envolvendo o uso de anestésicos em anfíbios são recentes e a maior parte da literatura encontrada generaliza o seu uso para: “anfíbios em geral” ou “anfíbios adultos”, sem considerar a possível existência de variância inter e intra-específicas, que podem influenciar de maneira negativa a resposta ao tratamento, causando, em última instância, o óbito do animal (TABELA 2).

Diversos estudos têm comprovado a existência de variação na resposta anestésica entre diferentes espécies e dentro da mesma espécie (STEHLY e GINGERICH, 1999; BLOUIN-DEMERS *et al.*, 2000; HOSKONEN e PIRHONEN, 2004; TSANTILAS *et al.*, 2006), o que demonstra a necessidade estudos mais abrangentes a fim de reduzir as extrapolações e aumentar a segurança e a eficácia do uso de anestésicos, não só para uso clínico (cirurgia e eutanásia) como também para manejo geral.

TABELA 2 – Síntese de alguns anestésicos utilizados em anfíbios por meio do método de imersão

Anestésico	Espécie	Peso	Concentração	Fonte
Álcool etílico	<i>R. pipiens</i> (adultos)		10%*	Lumb & Jones (1984)

Benzocaína	Anfíbios em geral		0,01%- 0,03%	Mitchell, 2009
Benzocaína	<i>R. pipiens</i>		200 mg/l	Cakir e Strauch (2005)
Benzocaína	Girinos e juvenis		200 - 300 mg/l	IACUC (Univ. of Arizona)
Benzocaína	Rãs adultas		200 - 300 mg/l*	Smith (2007)
Benzocaína	Anfíbios em geral		100 - 200 mg/l	Vet. Form. (Univ. Minnesota)
Clorobutanol	Anfíbios em geral (adultos)		0,20%	Lumb & Jones (1984)
Eugenol	<i>X. laevis</i>	90 a 140 g	350 mg/l	Guenette et al. (2007)
Eugenol	<i>R. pipiens e X. laevis</i>		318 mg/l - 350 mg/l *	Mitchell, 2009
Eugenol	<i>R. pipiens</i> (adultos)		310 - 318 mg/l	Lafortune et al. (2001)
Eugenol	Salamandra (<i>A. tigrinum</i>)		450 mg/l	Mitchell et al. (2009)
Isoflurane	<i>X. laevis e Bufo</i>		0,28%*	Mitchell, 2009
Isoflurane	<i>X. laevis</i>		0,03 - 0,06 ml/g	Reed (2005)
Orajel®	<i>Acris crepitans</i>	0,4 a 1,6 g	1,0 g/l	Smith (2007)
Orajel®	<i>Bufo fowleri</i>	2,1 a 27,3 g	1,0 g/l	Smith (2007)
Pentobarbital	<i>R. pipiens</i>		300 mg/l	Cakir e Strauch (2005)
Propoxato	<i>R. pipiens</i> (adultos)		16 ppm*	Lumb & Jones (1984)
MS-222	Anfíbios em geral		200 mg/l - 500mg/l	Mitchell, 2009
MS-222	<i>R. pipiens</i>	40 a 60 g	100-800 mg/L	Cakir e Strauch (2005)
MS-222	Rãs adultas e salamandras		500 - 2000 mg/l	IACUC (Univ. of Arizona)
MS-222	Rãs adultas		200 - 500 mg/l*	Smith (2007)
MS-222	<i>Acris crepitans</i>	0,4 a 1,6 g	0,5 g/l	Smith (2007)
MS-222	<i>Bufo fowleri</i>	2,1 a 27,3 g	0,5 g/l	Smith (2007)
MS-222	Anfíbios em geral (adultos)		acima de 1,0 g/l	Gentz (2007)
MS-222	Rãs adultas e salamandras		1 a 2 g/l	Lab Anim Resource, 2007

MS-222	Rãs adultas e sapos	2 a 3 g/l	Lab Anim Resource, 2007
MS-222	Rãs adultas	1:1000	CCAC(1993)
MS-222	<i>X. laevis</i>	300 - 500 mg/l*	Reed (2005)
MS-222	<i>R. pipiens</i> (adultos)	0,1%*	Lumb & Jones (1984)
MS-222	Anfíbios em geral	30 - 1500 mg/l*	Hendrik & Winwill (2002)

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, onde foram avaliados três compostos anestésicos, dos quais dois eram substâncias naturais, o eugenol e o mentol, e o terceiro sintético, a benzocaína. Cada fármaco foi avaliado quanto aos objetivos propostos, de acordo com as diferentes fases de desenvolvimento da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), ou seja, imago (5-10g, 20-30g), juvenil (80-100g) e adulto (120-160g) e girino (15, 30, 45, 60 e 75 dias de idade). Todos os animais utilizados neste trabalho (23.400 animais) foram provenientes do próprio Ranário Experimental.

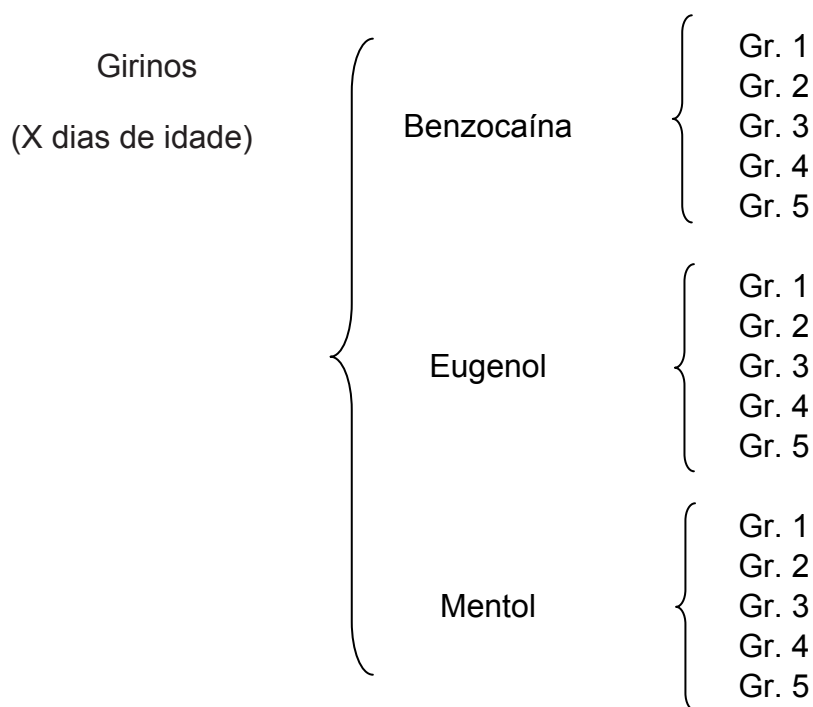
Os anestésicos avaliados foram comprados no comércio local, em farmácias especializadas na venda de produtos odontológicos ou em farmácias de manipulação. Tanto o mentol quanto o eugenol foram adquiridos na sua forma pura (99% a 100% de pureza) e, uma vez que possuem propriedades hidrofóbicas, foi necessária a diluição prévia desses compostos em álcool comum (96%). A solução padrão estabelecida foi de 0,1g de mentol por mL de solução (10%) e de 50g de eugenol por mL de solução (1:20), tornando-os, assim, mais solúveis em água. A benzocaína por sua vez foi adquirida já diluída, na concentração de 0,1g de benzocaína por mL de solução.

GIRINOS I

As desovas de rã-touro coletadas no setor de reprodução do Ranário Experimental, com o auxílio de uma jarra plástica, foram colocadas em caixas de fibrocimento com capacidade de 1000 litros, com uma pequena lâmina de água até a eclosão. As datas da desovas foram anotadas em cada caixa de fibrocimento para controle da idade dos animais. Aguardou-se o término das modificações embrionárias e a transformação das larvas em girinos. Após o desenvolvimento larval, o manejo diário adotado nas caixas de fibrocimento foi: troca parcial da água pela manhã, aproximadamente 10 a 20% do volume total da caixa, e alimentação dos animais seis vezes ao dia, com ração para peixes carnívoros, com 36% de proteína bruta, triturada e peneirada (granulometria compatível com a cavidade bucal), até que atingissem a idade desejada, ou seja, 15, 30, 45, 60 e 75 dias de idade.

O procedimento adotado para a avaliação dos anestésicos (benzocaína, eugenol e mentol) foi o mesmo para todas as faixas etárias. Assim, de acordo com a idade avaliada, uma amostra, ao acaso, foi coletada, com auxílio de uma peneira de plástico, com diâmetro de 15 centímetros, e colocada em um balde plástico, com capacidade para 5 litros, contendo 2,5 litros de água, proveniente da própria caixa de fibrocimento em que os animais estavam alocados. A amostra, então, foi levada ao laboratório, onde os girinos foram colocados em bandejas plásticas e, em seguida, contados e separados em grupos, de modo que cada grupo continha dez girinos. Para a determinação das concentrações mínimas e máximas para sedação

e anestesia, assim como, o tempo de indução, manutenção e retorno, de cada um dos anestésicos, foram utilizados cinco grupos de girinos para cada faixa etária (15, 30, 45, 60 e 75 dias), conforme exemplificado no esquema abaixo:



Após separados os cinco grupos e determinado o anestésico a ser avaliado, cada grupo foi alocado em uma cuba de vidro âmbar, contendo 1 litro de solução (água + anestésico), com diferentes concentrações do composto anestésico a ser avaliado (FIGURA 2A). Sob essas cubas foi colocada uma bandeja de plástico contendo água aquecida (FIGURA 2B), para manter constante a temperatura no interior das cubas, entre 36 a 37°C, medido, constantemente, por meio de termômetro infravermelho com mira a laser, durante todo o período experimental (360 minutos).



FIGURA 2 - Girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no interior da cuba de vidro contendo solução anestésica (A) sobre bandeja plástica com água aquecida (B).

Durante o período de indução (180 minutos), os animais foram avaliados, a cada 15 minutos, quanto ao reflexo de fuga (ReF) e à nocicepção (NoC). O primeiro reflexo observado a cada intervalo de tempo (15 minutos), durante o período de indução, foi o ReF, avaliado contando-se, individualmente, o número de animais que responderam à leve vibração da água (leve toque com a pinça cirúrgica na borda da cuba, as ondas mecânicas são transmitidas no meio material, estimulando o animal) e à leve movimentação da água. A resposta ou a não resposta, a estes dois estímulos levou à classificação dos animais, quanto ao reflexo de fuga, em presente ou ausente. Em seguida, acompanhou-se o número de animais que reagiram a uma leve pressão na base da cauda, reflexo nociceptivo, com o auxílio de uma pinça cirúrgica. Do mesmo modo como na avaliação do ReF, a resposta ou não dos girinos de rã-touro, levou a classificação dos animais quanto à NoC em presente ou

ausente. Os que não esboçaram qualquer reação ao teste de ReF, mas reagiram a NoC, foram considerados sedados e aqueles que além de não reagirem a ReF e, nem tão pouco, ao NoC foram considerados anestesiados.

Após o período de indução, os animais foram retirados da solução anestésica e colocados em cubas vidro, contendo 1 litro de água sem anestésico, onde os girinos foram mantidos até que todos apresentassem comportamento normal. Nesta fase, denominado período de retorno, os animais foram avaliados, da mesma forma como o realizado no período de indução, a cada 15 minutos, quanto a ReF e NoC, seguindo a mesma metodologia, até que todos restabelecessem o comportamento normal ou por um prazo máximo de 180 minutos. Passados esse prazo, os animais que não responderam a qualquer estímulo foram classificados como mortos.

Para cada faixa etária, diferentes concentrações crescentes dos três anestésicos foram avaliadas, quanto à sedação e anestesia dos animais, até o limite máximo de 50% de mortalidade. De acordo com os resultados obtidos, cinco concentrações foram selecionadas, de modo que a menor concentração induzisse à sedação, em pelo menos 10% dos animais, e a máxima induzisse tanto à sedação quanto à anestesia, em 100% dos animais, excluindo-se as dosagens que levassem a óbito mais de 50% dos girinos (TABELA 3).

TABELA 3 – Concentrações (mg/L) mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação e à anestesia em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em diferentes faixas etárias

Idade (dias)	Concentração mg/L		
	Benzocaína	Eugenol	Mentol
15	10 – 30	5 - 25	20 – 40
30	30 – 50	10 - 30	10 – 30
45	45 – 65	10 - 30	20 – 40
60	30 – 70	15 - 35	20 – 60

4.2. FASE 1 – GIRINOS II

Visou-se simular o transporte de girinos de rã-touro, em diferentes faixas etárias (30, 45, 60 e 75 dias de idade), sob a ação dos três anestésicos.

Assim como na fase anterior os procedimento e manejos adotados, desde a coleta das desovas à obtenção dos girinos nas faixas etárias de 30, 45, 60 e 75 dias de idade, foram os mesmos da fase anterior.

Para a avaliação dos anestésicos (benzocaína, eugenol e mentol), o procedimento adotado foi o mesmo para todas as faixas etárias. Assim, de acordo com a idade avaliada, uma amostra, ao acaso, foi coletada, com auxílio de uma peneira de plástico, com diâmetro de 15 centímetros, e colocada em um balde plástico, com capacidade para 5 litros, contendo 2,5 litros de água, proveniente da própria caixa de fibrocimento em que os animais estavam alocados. A amostra, então, foi levada ao laboratório, onde os girinos foram colocados em bandejas plásticas e, em seguida, contados e separados, em grupos (FIGURA 3).



FIGURA 3 - Amostra de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), com 45 dias de idade, sendo contadas e separadas para posterior indução anestésica.

Para cada um dos três anestésicos foram separados, seis a oito grupos, contendo 200 girinos cada, que foram, em seguida, acondicionados em sacos plásticos, medindo 50 cm x 60 cm, contendo 10 litros de solução anestésica (água + anestésico), em concentrações crescentes, e oxigênio, o suficiente para completar o volume do saco, deixando apenas o espaço necessário para se vedar a abertura da embalagem e impedir a volatilização do gás (FIGURA 4).



FIGURA 4 – Grupos de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) induzidos a sedação, por meio de diferentes concentrações de benzocaína, eugenol e mentol, simulando o transporte dos animais.

Embora essa fase experimental tenha sido realizada sem o controle da temperatura ambiente, as temperaturas, da água e do ambiente local, foram aferidas, por meio de termômetro digital com mira a laser, no início do experimento, no momento da indução dos animais (Tabela 4).

Na faixa etária de 60 dias, as temperaturas da água aferidas, no início da indução anestésica, tanto para a benzocaína quanto para o mentol e o eugenol foram superiores as das demais faixas etárias. As variações observadas foram de 1,60 °C, 2,20 °C e 2,30 °C a menos do que a observada na faixa etária de 60 dias, para os animais com 30, 45 e 75 dias de idade, respectivamente. Em peixes, essa variação na temperatura da água poderia ser uma fonte de variação nos resultados obtidos, uma vez que pequenas alterações na temperatura afetam o metabolismo do animal e, conseqüentemente a resposta anestésica. Porém, os anfíbios ao contrário dos peixes possuem a glândula tireóide bem desenvolvida, o que minimiza os efeitos

da variação de temperatura do ambiente. Assim, a pequena variação térmica observada na água das diferentes faixas etárias não leva a alterações drásticas no metabolismo dos girinos, devido à ação da tiroxina produzida pela tireóide, não influenciando a resposta anestésica.

Tabela 4 – Temperatura da água e do ambiente (°C) aferidos no início da indução anestésica, por meio da benzocaína, eugenol e mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias

Idade (dias)	Benzocaína	Eugenol	Mentol
Temperatura da água (°C)			
30	23,80	23,80	23,80
45	23,20	23,20	23,20
60	25,40	25,40	25,40
75	23,10	23,10	23,10
Médias	23,88	23,88	23,88
Desvios	0,9241	0,9241	0,9241
Temperatura do ambiente (°C)			
30	24,00	24,00	24,00
45	24,00	24,00	24,00
60	23,00	23,00	23,00
75	24,00	24,00	24,00
Médias	23,75	23,75	23,75
Desvios	0,5000	0,5000	0,5000

Nesta fase, durante o período de indução, os grupos foram avaliados somente quanto ao número de animais induzidos (NI) à sedação, a princípio, a cada 1 hora, durante as 5 horas iniciais e, posteriormente, somente após 24 horas do início da indução anestésica. Uma vez que, nesta fase a nocicepção não foi

avaliada, os animais foram considerados apenas sedados, apresentando ausência de movimento mesmo após estímulo externo (movimentação dos sacos).

Após a observação de NI, a cada hora, durante as cinco horas iniciais, um grupo de cada concentração e de cada anestésico foi retirado da solução anestésica e colocado em caixas plásticas em recuperação com capacidade para 45 litros, contendo 10 litros de água corrente, a temperatura ambiente, para avaliação do período de retorno, ou seja, o tempo necessário para que o maior número de girinos restabelecessem o comportamento normal, caracterizado pela resposta imediata a movimentação da água. Observou-se, então, o número de animais que restabeleceram o comportamento normal (NR) e o tempo necessário para que isso ocorresse, ou seja, o tempo de retorno (TR).

Passado as 24 horas, o mesmo procedimento anterior foi adotado, todos os grupos de girinos foram retirados da solução anestésica e colocados caixas plásticas, com capacidade para 45 litros, contendo 10 litros de água corrente, a temperatura ambiente, para avaliação do período de retorno. Observou-se, então, o número de animais que restabeleceram o comportamento normal (NR) e o tempo necessário para que isso ocorresse, ou seja, o tempo de retorno (TR). O TR estabelecido foi o tempo necessário para que o maior número de girinos restabelecessem o comportamento normal ou o tempo máximo de 180 minutos (prazo máximo estabelecido para o restabelecimento do comportamento normal).

De acordo com o número de girinos sedados ou não sedados, NI e NR foram categorizados em quatro classes distintas: 1, quando 100% dos girinos (200 animais) apresentavam comportamento normal (não sedados); 2, quando mais de 50% estavam sedados (100 – 199 animais); 3, quando menos de 50% (1-99

animais) apresentavam ausência de movimento, após estímulo externo; 4, 100% dos animais estavam sedados.

Baseado nos resultados obtidos, cinco concentrações foram selecionadas (TABELA 5), excluindo a princípio os tratamentos que apresentaram mortalidade igual ou superior a 60%. Posteriormente, a concentração máxima foi estabelecida, de modo que, esta induzisse a sedação em menos de 3 minutos, a mantivesse por um período de cinco horas e o NR fosse superior a 50%. O terceiro e último parâmetro determinado foi à concentração mínima. Esta foi selecionada de modo que induzisse à sedação, em pelo menos 50% dos animais, nas primeiras duas horas.

TABELA 5 – Concentrações (mg/L) mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias

Idade (dias)	Concentração mg/L		
	Benzocaína	Eugenol	Mentol
30	10 – 30	5 – 25	10 – 30
45	10 – 30	5 – 25	10 – 30
60	15 – 35	10 – 30	15 – 35
75	10 – 30	10 – 30	10 – 35

4.3. FASE 2 – IMAGOS, JUVENIS E ADULTOS

Nesta fase, os animais oriundos do setor de recria do Ranário Experimental foram separados de acordo com o peso em quatro classes: imagos I (animais com peso entre 5g a 10g), imagos II (20g a 30g), juvenis (80g a 100g) e adultos (120g a

160g). De acordo com essas quatro classes de peso, os animais foram acondicionados em baias aquecidas, com área total de 22,5 m² (5 m x 4,5 m). A densidade máxima mantida em cada baia foi de 6,66 imagos I/m², 4,44 imagos II/m², 2,22 juvenis/m² e 1,50 adultos/m². Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia, com ração comercial para peixes carnívoros com 36% de proteína bruta e granulometria compatível com a cavidade bucal, após a troca da água e limpeza das baias.

Para cada um dos três anestésicos (benzocaína, eugenol e mentol) avaliou-se as quatro classes de peso, de modo que, cada classe foi submetida a 10 tratamentos, com concentrações crescentes de solução anestésica, contendo dez animais/tratamento. Assim, no total, considerando os três compostos anestésicos, foram utilizados nesta fase experimental 1200 animais, com pesos variando entre 5 a 160g (TABELA 6).

TABELA 6 - Número de animais por tratamento e número total de animais por classe de peso, de imagos, juvenis e adultos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), submetidos, a dez tratamentos por classe de peso, a benzocaína, eugenol e mentol

Anestésico	Classe de peso (g)	Tratamentos	Nº de animais/tratamento	Nº total de animais/classe de peso
Benzocaína	5-10	10	10	100
	20-30	10	10	100
	80-100	10	10	100
	120-160	10	10	100
Eugenol	5-10	10	10	100
	20-30	10	10	100
	80-100	10	10	100
	120-160	10	10	100
Mentol	5-10	10	10	100
	20-30	10	10	100
	80-100	10	10	100

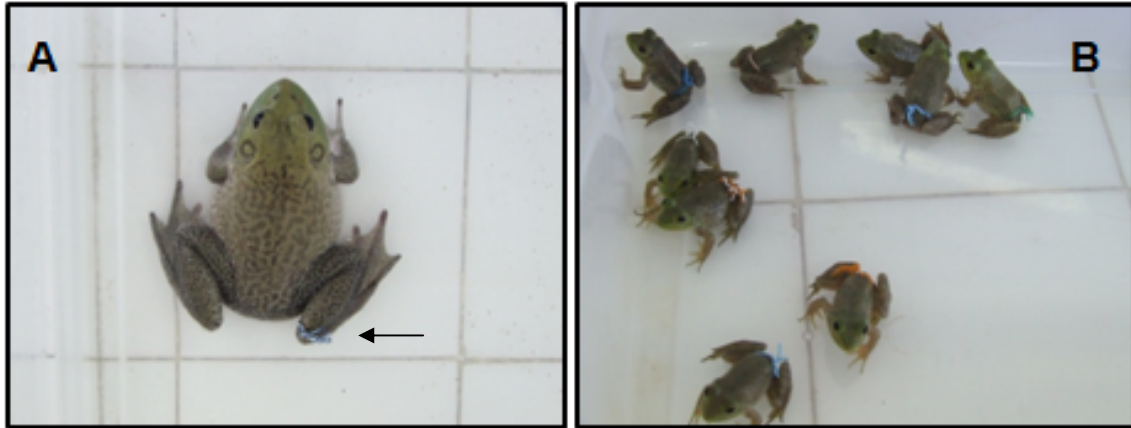
As médias e desvios de peso e CRC, por classe de peso (imagos, juvenis e adultos) dos animais avaliados no experimento estão demonstrados na Tabela 7.

TABELA 7 - Médias e desvios de peso (g) e CRC (mm) de imagos I (5g a 10g), imagos II (20g a 30g), juvenis (80 a 100g) e adultos (120 a 160g) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) nos três anestésicos avaliados (benzocaína, eugenol e mentol)

Classe de Peso	Benzocaína		Eugenol		Mentol	
	Peso (g)					
	Médias	Desvios	Médias	Desvios	Médias	Desvios
Imagos I	7,1454	1,2075	7,0954	1,2263	6,7436	1,2669
Imagos II	23,6812	2,4488	23,2734	2,0545	23,0268	2,4618
Juvenis	89,0656	8,9897	93,3778	12,9244	89,5502	8,8379
Adultos	140,7564	18,0040	136,2302	12,8741	131,5106	7,6674
	CRC (mm)					
	Médias	Desvios	Médias	Desvios	Médias	Desvios
Imagos I	43,9886	2,0563	44,1744	3,1490	42,254	5,28314
Imagos II	65,5640	2,1370	64,4422	2,4841	64,9192	5,9905
Juvenis	101,9176	4,7351	101,5360	4,4031	102,3910	4,4119
Adultos	117,8402	4,1478	114,3428	3,6284	113,0155	3,2786

Vinte quatro horas antes do início do experimento e determinada a classe de peso a ser avaliada no dia seguinte, quatro grupos, com dez animais cada, pertencentes a essa classe de idade, foram retirados das baias e transportados para uma baia adjacente, onde foram mantidos em jejum. Após esse período de restrição alimentar (24 horas), os animais foram pesados, em balança analítica de precisão 0,001g, medidos, mensurou-se o comprimento rostro-cloacal (CRC), por meio de paquímetro digital de precisão 0,001 cm, e marcados, com fios coloridos (FIGURA 5), segundo a metodologia adotada por Camargo Filho (2008). Animais jovens e

adultos, 80g a 160g, foram marcados na pata direita, enquanto que os imagos (5g a 30g) foram marcados na cintura pélvica.



com marcação na cintura pélvica (B).

Em seguida os animais foram acondicionados em caixas plásticas, com capacidade de 45 litros, contendo a solução anestésica a ser avaliada. Na fase de 5g a 30g (imagos I e imagos II) e de 80g a 160g (juvenis e adultos), os volumes de solução anestésica utilizados foram de um e dois litros, respectivamente, de modo que os animais ficassem com, aproximadamente, 1/3 do corpo imerso na solução (FIGURA 6). Evitando dessa forma o afogamento dos animais quando estes perderam, por completo, o tônus muscular.



FIGURA 7 – Imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) imersos em um litro de solução anestésica. Em detalhe, altura da solução em contato com o animal.

Embora o experimento tenha sido conduzido em ambiente natural, ou seja, sem o controle da temperatura, a averiguação da temperatura da água e do ambiente foi realizada no início do experimento, durante o preparo da solução anestésica, por meio de termômetro digital com mira a laser (TABELA 8).

TABELA 8 – Médias e desvios das temperaturas da água e do ambiente, por anestésico e por classe de peso de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) induzidos à sedação e à anestesia

Classe de Peso	Benzocaína		Eugenol		Mentol	
Temperatura da água (°C)						
	Médias	Desvios	Médias	Desvios	Médias	Desvios
Imagos I	24,60	1,75	21,80	0,54	27,10	1,92
Imagos II	19,04	0,82	17,44	0,69	19,20	0,76
Juvenis	18,00	1,69	22,80	0,76	20,80	2,59
Adultos	20,80	0,76	18,80	1,48	22,20	0,99
Temperatura do ambiente (°C)						
	Médias	Desvios	Médias	Desvios	Médias	Desvios
Imagos I	24,80	0,99	23,20	0,25	22,50	2,76
Imagos II	21,00	0,00	19,80	0,76	21,00	1,28
Juvenis	18,00	1,69	22,00	1,69	20,20	1,62
Adultos	21,20	0,40	19,40	1,21	22,20	0,99

A metodologia adotada para a avaliação dos três anestésicos foi a mesma, independente da classe de peso observada. Assim, os animais foram avaliados, individualmente, a cada 15 minutos por um período de 5 horas (período de indução), quanto aos movimentos gulares, à presença (normal ou lenta) ou ausência de reflexo de fuga e de equilíbrio, e quanto à sensibilidade a nocicepção leve (normal ou lenta) e a nocicepção profunda.

O primeiro parâmetro observado a cada intervalo de tempo (15 minutos) foi a frequência respiratória. Então, logo após a retirada do animal da caixa plástica, antes de iniciar qualquer estímulo, a frequência respiratória foi acompanhada, contando-se o número de movimentos gulares (MovG) realizados durante um minuto e, de acordo com esse número, classificados em normal (MovG=1; 78 a 108 MovG/min), médio (MovG=2; 42 a 72 MovG/min), baixo (MovG=3; 6 a 36 MovG/min) e ausente (MovG=4).

Em seguida os demais parâmetros foram observados, seguindo a sequência: reflexo de fuga (ReF), equilíbrio (EqL), nocicepção leve (NocL) e nocicepção profunda (NocP).

O reflexo de fuga foi avaliado colocando-se o animal por sobre a bancada e observando seu comportamento. Nos casos em que os animais fugiram de imediato, tão logo posto por sobre a bancada, o ReF foi considerado normal. Para os animais que necessitaram de um tempo, menor que 10 segundos, para a fuga, o ReF foi estabelecido como lento e aqueles que não esboçaram qualquer reação de fuga em 10 segundos, o ReF foi classificado como ausente.

A ausência ou presença de equilíbrio foi avaliada cronometrando-se o tempo necessário para que os animais retornassem a posição normal após serem colocados, sobre uma superfície plana, e não escorregadia, em decúbito dorsal (FIGURA 7).



FIGURA 7 – Imago de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), induzido a seditação, colocado sobre uma bancada plana, em decúbito dorsal, para avaliação da presença ou ausência de reflexo de equilíbrio.

Os animais que retornaram à posição normal de imediato, o EqL foi classificado como presente e normal. Nos casos em que os animais não retornaram à posição normal de imediato, mas o fizeram em menos de dez segundos, o EqL foi categorizado como presente e lento, e nos casos em que os animais não esboçaram qualquer reação, permanecendo em decúbito dorsal, por mais de dez segundos, o reflexo de equilíbrio foi considerado ausente.

A nocicepção leve (NocL) foi avaliada por meio de uma leve pressão, com auxílio de uma pinça cirúrgica, no quarto dedo da pata posterior direita dos animais (FIGURA 8).

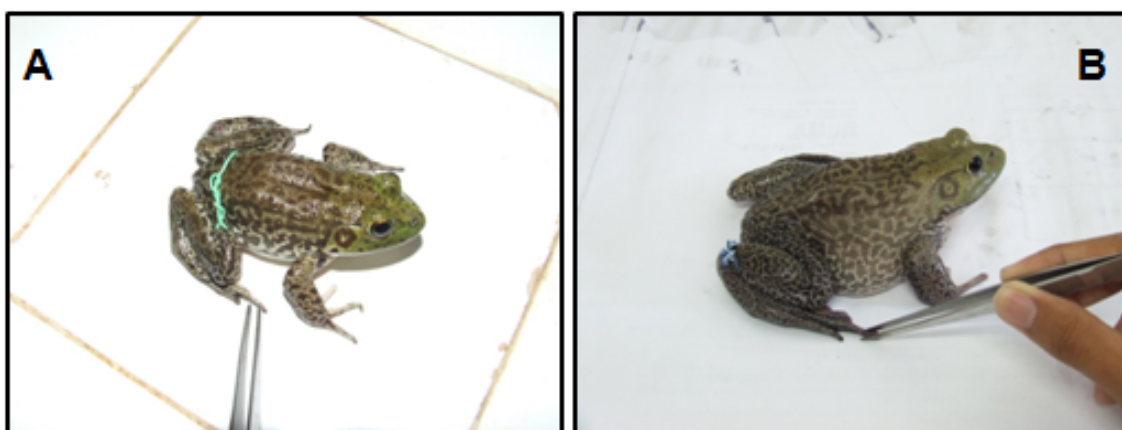


FIGURA 8 – Leve pressão, com auxílio de pinça cirúrgica, na pata traseira, de imago (A) e adulto (B) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), para determinação de presença ou ausência de reflexo nociceptivo leve, após indução anestésica.

Do mesmo modo como na avaliação dos outros reflexos, quando os animais responderam ao estímulo de imediato e de forma abrupta, o reflexo nociceptivo foi considerado normal. Nos casos em que a resposta demorou alguns segundos ou não houve resposta, após uma sequência de três tentativas consecutivas, o NocL foi classificado, então, como lento ou ausente, respectivamente.

A avaliação do reflexo à nocicepção profunda (NocP) foi feita somente após constatação da ausência de qualquer resposta aos outros estímulos (ReF, EqL, MovG e NocL), por ser um teste mais invasivo. Assim, uma vez que, os animais não apresentaram reação aos estímulos anteriores, com o auxílio de uma haste flexível com ponta de algodão, aplicou-se uma leve pressão nos olhos dos animais (FIGURA 9). Os animais que responderam positivamente ao estímulo, o NocP foi classificado como normal, caso contrário, como ausente.



FIGURA 9 - Leve pressão, com auxílio de uma haste flexível com ponta de algodão, na ocular de um exemplar adulto de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), para determinação de presença ou ausência de reflexo nociceptivo profundo, após indução anestésica.

Após o período de indução (5 horas), os animais foram retirados da caixa contendo solução anestésica e alojados em caixa plástica, de mesmo volume (45 L), contendo 1 litro de água corrente, no caso de imagos, ou 2 litros, no caso de juvenis

e adultos, até que restabelecessem o comportamento normal, fase denominada de período de retorno. Nesse período os animais foram também avaliados a cada 15 minutos, quanto a ReF, EqL, MovG, NocL e NocP, conforme relatado anteriormente para o período de indução, durante 5 horas.

Foram avaliadas dez concentrações crescentes de cada anestésico, em cada uma das quatro classes de peso e, de acordo com os resultados obtidos, cinco concentrações, por anestésico e por faixa de peso, foram selecionadas (TABELA 9). A máxima concentração foi aquela que induziu 100% dos animais à anestesia profunda e levou a óbito 30% dos animais quando mantidos em solução por um período de cinco horas e a concentração mínima selecionada induziu os animais apenas à sedação.

TABELA 9 – Concentrações mínimas a máximas de benzocaína, eugenol e mentol para indução à sedação e à anestesia de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas de peso

Faixa de Peso	Concentração (mg/L)		
	Benzocaína	Eugenol	Mentol
5g – 10g	50 – 90	60 – 140	60 – 100
20g – 30g	50 – 150	50 – 150	50 – 150
80g – 100g	60 – 140	50 – 150	50 – 150
120g – 160g	60 – 140	75 – 175	75 – 175

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez que, as concentrações utilizadas de cada anestésico, para cada faixa etária assim como para cada classe de peso, foram diferentes, a comparação

entre os três anestésicos foi realizada pelas curvas de regressão obtidas. Além, de modelos de regressão lineares simples e de platô, modelos de regressão não lineares foram utilizados para o melhor ajustamento dos dados, com o auxílio do pacote estatístico SAEG. Os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão utilizando-se o teste t, adotando-se o nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade, no coeficiente de determinação ($R^2 = \text{S. Q. regressão} / \text{S. Q. Tratamento}$) e no fenômeno biológico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. FASE 1 – GIRINOS I

Em todos os testes realizados e em todas as faixas etárias a reação dos girinos de rã-touro, ao primeiro contato com os anestésicos avaliados, foi de hiperatividade, caracterizada pela rápida movimentação na cuba.

A hiperatividade inicial observada durante a indução anestésica por meio do eugenol foi igualmente relatada para juvenis de zebrafish (*Danio rerio*), pintado (*Pseudorasbora parva*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) (GRUSH *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2007b, VIDAL *et al.*, 2008). Mylonas *et al.* (2005) imputaram essa reação (hiperatividade) à ação apenas do eugenol, uma vez que, os exemplares de *Sparatus aurata* e *Dicentrarchus labrax*, por eles avaliados, não apresentaram reações adversas à quantidade de álcool utilizado na diluição do anestésico. Resultado que corrobora com os obtidos por Mylonas *et al.* (2005) foi apresentado por Grush *et al.* (2004), onde os autores relataram a ausência de alterações comportamentais em “zebrafish” (*Danio rerio*) expostos a 1440 ppm de álcool por 96 horas.

Valente (2009) e Oliveira (2009) também relataram a ocorrência de hiperatividade logo após indução anestésica por meio de benzocaína, mentol e eugenol em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon*

cephalus), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e trairão (*Hoplias lacerdae*).

Segundo Collins (1978) a hiperatividade é o primeiro comportamento observado em um animal induzido a anestesia.

Após a hiperatividade inicial, o comportamento dos girinos seguiu o seguinte padrão: natação lenta; imobilização dos animais, em que a natação só foi observada após estímulo externo (vibração da água e/ou leve movimentação das cubas e pinçada leve na base da cauda), ausência total dos movimentos; parada dos animais em decúbito dorsal e, em alguns casos, na posição lateral.

3.7.3. Eugenol

5.1.1.1. Faixa Etária: 15 dias

Nesta faixa etária as concentrações de eugenol utilizadas foram de 5 mg/L (T₁), 10 mg/L (T₂), 15 mg/L (T₃), 20 mg/L (T₄) e 25 mg/L (T₅) de eugenol.

Na dosagem de 5 mg/L, 50% dos girinos foram sedados após 15 minutos de imersão, estado mantido por 180 minutos, em 30% dos girinos, e por 165 minutos em 20% dos animais. Apenas um caso de anestesia foi observado, após 15 minutos de imersão, com duração de 180 minutos. A ocorrência de anestesia no tratamento T₁ foi um caso isolado e não observado nas concentrações seguintes indicando que o girino anestesiado se tratava de um animal debilitado ou mais sensível ao anestésico.

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir na eficácia de um anestésico, resultando em não indução anestésica ou indução de uma pequena parcela da população. Entretanto, é pouco provável que fatores abióticos como temperatura, pH e salinidade, tenham interferido nos resultados levando a não indução dos animais, uma vez que, todos os animais utilizados em cada um dos tratamentos, foram alocados ao mesmo tempo no interior das respectivas caixas plásticas contendo solução anestésica previamente homogeneizada. Dentre os fatores biológicos que poderiam interferir na ação de um anestésico citam-se variação individual (genética), tamanho ou peso, maturidade sexual, condição corporal (conteúdo de reserva corporal), estado de saúde e estresse (ROUBACH *et al.*, 2002; KING *et al.*, 2005; ROSS e ROSS, 2008).

Excluindo a variação de peso e tamanho, a influência da maturidade sexual, a condição corporal e o estado de saúde, visto que todos os animais utilizados pertenciam à mesma desova, restam apenas o estresse e a variação individual (genética).

Uma vez que todos os animais utilizados foram criados no mesmo local e sob as mesmas condições de manejo sanitário, profilático e alimentar (ração com 36% PB, *ad libitum*), acredita-se que, se houve diferenças entre eles, com respeito ao nível de estresse, provavelmente, essas variações são do próprio indivíduo devido à variabilidade fisiológica e não devido a fatores abióticos.

No tratamento T₁, 50% dos girinos foram sedados após 15 minutos de imersão e a anestesia não foi alcançada. Provavelmente, essa baixa eficiência seja devido à baixa dosagem anestésica utilizada, não sendo o suficiente para sedação e anestesia dos animais nessa faixa etária. Entre os animais sedados, o tempo médio

de manutenção a sedação foi de 174 ± 8 minutos e o tempo médio de retorno de 15 minutos.

No tratamento T_2 , 60% da população amostral foram sedadas após 15 minutos de imersão em solução anestésica. Porém, nessa dosagem, a anestesia assim como tratamento anterior não foi atingida. Dentre os animais sedados, essa condição foi mantida por um período de 180 minutos e o retorno ao estado normal ocorreu após 15 minutos de imersão em água livre de anestésico.

Nos tratamentos seguintes ($T_3= 15$ mg/L, $T_4= 20$ mg/L e $T_5= 25$ mg/L), todos os animais induzidos à anestesia (100% da população amostral) alcançaram o estágio de sedação após 15 minutos de imersão na solução anestésica. No tratamento T_3 , 30% dos animais mantiveram a sedação por menos de 60 minutos ($TM_{\text{médio}}= 50 \pm 9\text{min}$) e os demais por em média $163 \pm 29\text{min}$. Em razão do pequeno número de animais que permaneceram sedados por menos de uma hora (três animais), provavelmente devido à maior resistência desses girinos ao composto anestésico (variação individual), o tempo médio de manutenção à sedação nesse tratamento foi menor do que nos demais tratamentos ($TM_{\text{médio}}= 129 \pm 59\text{min}$). Nos tratamentos T_4 e T_5 a sedação foi mantida por 180 minutos, em 100% dos casos, e o retorno ocorreu, em média, após $21 \pm 10\text{min}$ e $19 \pm 11\text{min}$, respectivamente, de imersão em água pura. No tratamento T_3 , dentre os animais sedados por 180 minutos (50% da população), o tempo de recuperação foi de 15min.

A anestesia foi observada a partir da dosagem de 20 mg/L de eugenol (T_4) e em 100% dos animais amostrados tanto em T_4 quanto em T_5 . Esse estado foi mantido por 180 minutos, em ambos os casos, e o tempo de recuperação foi de $18 \pm$

9min para o tratamento T₄ e de 14 ± 8min para o tratamento T₅, em que foi observado o não retorno de 20% da população amostrada.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em função da concentração de eugenol, na faixa etária de 15 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
5	7	80	4	-	-	-
10	11	112	8	-	-	-
15	13	142	14	-	-	-
20	15	165	15	15	111	15
25	16	180	17	16	180	16

Os tempos de indução à sedação (T_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R² de 0,8953. Os valores obtidos pela regressão nos tratamentos iniciais (T1 e T2), inferiores aos valores médios citados anteriormente ocorreram, provavelmente, devido ao ajustamento dos dados pelo modelo de regressão, que considerou toda a população amostral e não apenas a que alcançou a sedação (50%) como no caso da obtenção do tempo médio à sedação citado anteriormente. Todavia, em função da baixa eficiência desses dois tratamentos na indução à sedação e à anestesia essa

subestimação dos valores torna-se irrelevante, uma vez que, o uso delas é desaconselhável.

De acordo com o modelo de regressão, a partir da dosagem de 16,65 mg/L de eugenol, onde se encontra o ponto de curvatura máximo (ponto em que TI_{sed} começa a estabilizar), o tempo de indução à sedação dos girinos tende à estabilidade, ou seja, aumentos na dosagem anestésica não levam a aumentos ou a reduções de TI_{sed} (FIGURA 10).

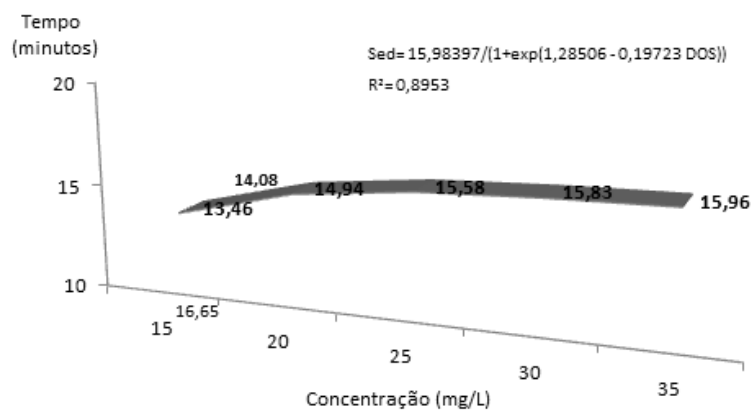


FIGURA 10 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Resultados que corroboram com os obtidos (tempo de indução tendendo à estabilidade) foram relatados por Inoue *et al.* (2003) e Vidal *et al.* (2008; 2007a; 2007b) ao avaliarem a eficácia do eugenol como anestésico para juvenis de *B. cephalus*, e juvenis de *O. niloticus*, *L. macrocephalus* e *B. cephalus*, respectivamente, em que, de acordo como os autores, o tempo de indução nestas espécies tendeu à estabilidade com o aumento da dosagem anestésica.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9352. De acordo com o modelo de regressão, a partir da dosagem de 23,46 mg/L de eugenol, onde se encontra o ponto de curvatura máximo (ponto em que TM_{sed} começa a estabilizar), aumentos na dosagem anestésica não levam ao aumento do tempo de manutenção à sedação (FIGURA 11).

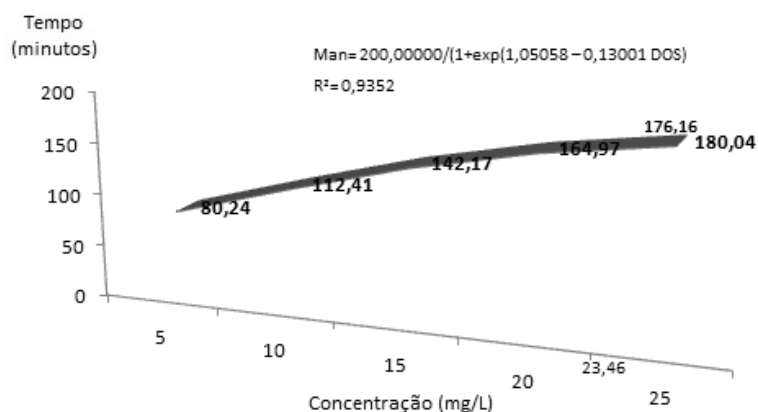


FIGURA 11 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Logo, a partir desse ponto, o aumento da concentração anestésica não apresenta ganhos na eficiência de manutenção à sedação, mas leva ao aumento da probabilidade de óbitos e ao gasto desnecessário de anestésico e, conseqüentemente, ao aumento dos custos de operação.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,6612. De acordo o modelo, até a dosagem de 23,10 mg/L, onde se encontra o ponto de curvatura

máximo (ponto em que TR_{sed} começa a estabilizar), para cada acréscimo na concentração da solução anestésica de 1 mg/L de eugenol houve o aumento de 0,60 minutos no tempo de recuperação. Todavia, a partir desse ponto, aumentos na dosagem anestésica não levam a alterações significativas no tempo de retorno à sedação (FIGURA 12).

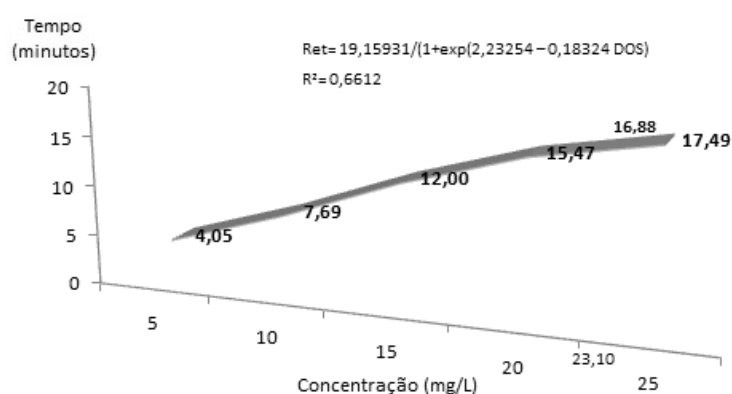


FIGURA 12 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoide simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9801, segundo o qual TI_{ane} assim como TI_{sed} apresentou tendência à estabilização nas últimas dosagens (T_4 e T_5), com o tempo médio de $15,5 \pm 0,7$ min.

Os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7862. TM_{ane} apresentou comportamento crescente, onde foi observado que a partir de T_4 , o

aumento de 1 mg/L de eugenol levava ao aumento do tempo de manutenção à anestesia de 13,89 minutos.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9437. Assim como o observado no tempo de indução à anestesia, a partir da dosagem de 20 mg/L, TR_{ane} apresentou tendência a estabilização ($15,5 \pm 0,7$ min).

As equações de regressão ajustadas para as variáveis tempos de indução (TI_{ane}), tempos de manutenção (TM_{ane}) e tempos de retorno (TR_{ane}) à anestesia encontram-se na Tabela 11.

TABELA 11 - Equações de regressão ajustadas para as variáveis tempos de indução (TI_{ane}), tempos de manutenção (TM_{ane}) e tempos de retorno (TR_{ane}) à anestesia, em função da concentração de eugenol em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias

Variáveis	Equações ajustadas	R^2
TI_{ane}	$16,03595/(1+\exp(20,00000 - 1,15529 \text{ DOS}))$	0,9801
TM_{ane}	$32,40000 - 8,43429 \text{ DOS} + 0,617143 \text{ DOS}^2$	0,7862
TR_{ane}	$15,89669/(1+\exp(20,00000 - 1,17342 \text{ DOS}))$	0,9437

5.1.1.2. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas de óleo de cravo foram de 10 mg/L (T_1), 15 mg/L (T_2), 20 mg/L (T_3), 25 mg/L (T_4) e 30 mg/L (T_5) de eugenol.

Na dosagem de 10 mg/L, a sedação ocorreu em 100% dos animais após, em média 26 ± 7 min. Porém, nessa concentração, a anestesia não foi alcançada provavelmente, em razão da baixa dosagem anestésica utilizada.

No tratamento T₂, a sedação ocorreu após um tempo médio de indução de 15 ± 2 min, em 80% dos girinos (oito animais) e a anestesia, após 45 minutos em 40% dos animais (quatro animais). Uma vez que a parcela da população anestesiada não foi significativa (inferior a 60%), admite-se que estes animais se tratassem de indivíduos mais sensíveis à ação do fármaco, de modo que para essa faixa etária a dosagem de 15 mg/L foi considerada ineficaz para indução à anestesia.

No tratamento T₃ (20 mg/L) tanto a sedação quanto a anestesia foram alcançadas em 100% da população amostral, após em média 17 ± 5 min e 20 ± 5 min, respectivamente.

Nos tratamentos seguintes (T₄ e T₅) 100% dos girinos foram sedados e anestesiados após 15 ± 2 min de indução anestésica.

A manutenção à sedação em T₁ foi de 164 ± 5 min, não sendo necessária a imersão dos animais a água livre de anestésico para o completo restabelecimento dos animais, confirmando a hipótese de baixa dosagem utilizada.

Na dosagem de 15 mg/L, a manutenção à sedação e à anestesia foram, em média, de 167 ± 20 min e 139 ± 45 min, respectivamente. Apenas um indivíduo manteve-se anestesiado por 180min, necessitando ser posto em água pura para o restabelecimento do comportamento normal, o que confirma a hipótese de baixa eficácia dessa dosagem na indução à anestesia de girinos na faixa etária de 30 dias.

Nos tratamentos seguintes tanto a sedação quanto a anestesia foram mantidas por 180 ± 3 min, por 100% da população amostral.

Em T₄, o retorno a anestesia em 100% dos casos ocorreu após 30 minutos e o restabelecimento do comportamento normal (retorno à sedação) após 30min e 45 min, em 60% e 40% da população amostral. Na dosagem de 30 mg/L (T₅), após um período de 180 minutos de imersão, 100% dos girinos vieram a óbito. Possivelmente, o óbito dos girinos tenha ocorrido devido à dosagem elevada de anestésico utilizada ou ao tempo excessivo de exposição, uma vez que, todos os animais, sem exceção, vieram a óbito. Devido às características físico-químicas do óleo de cravo, talvez este tenha se aderido às brânquias dos girinos, dificultando a eliminação do produto e aumentando indiretamente o tempo de exposição ao fármaco, aprofundando a anestesia em demasia, culminando na morte dos animais.

Sladky *et al.* (2001), ao avaliarem a eficácia de óleo de cravo na indução anestésica de pacus, (*Piaractus brachypomus*), relataram que os peixes submetidos à anestesia com eugenol nas concentrações de 100 e 200mg/L, apresentaram tempo de recuperação elevado, e que alguns necessitaram ser reanimados. Segundo os autores, a natureza persistente do óleo de cravo, na superfície das brânquias, pode ter aumentando efetivamente o tempo de exposição e, conseqüentemente, prolongado o tempo de recuperação dos animais.

Segundo King *et al.* (2005), doses elevadas de eugenol são frequentemente associadas ao prolongamento do tempo de recuperação e ao aumento significativo da mortalidade.

De acordo com a metodologia, a menor concentração escolhida deveria induzir à sedação no mínimo 10% dos animais e a máxima induzir 100% dos animais tanto à sedação quanto à anestesia, excluindo-se as dosagens que levassem a óbito mais de 50% dos girinos. Entretanto, embora o tratamento T₅ tenha

induzido a óbito 100% dos girinos, essa concentração foi selecionada porque doses menores de eugenol (5 mg/L) não surtiram efeito; e por essa dosagem induzir a sedação e a anestesia de forma rápida. Provavelmente, se o período de exposição à solução anestésica fosse menor, os animais não tivessem vindo a óbito.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, ajustados pela regressão, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 – Valores ajustados pela regressão das variáveis tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias, induzidos por meio de concentrações crescentes de eugenol

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
10	23	152	-	-	-	-
15	17	159	19	17	56	16
20	14	167	29	17	180	25
25	14	175	25	17	180	22
30	16	183	-	17	180	-

Nesta faixa etária, os tempos de indução à sedação (TI_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração. TI_{sed} apresentou comportamento decrescente, indicando que aumentos na concentração anestésica levam a redução no tempo de indução à sedação, 0,36 minutos para cada acréscimo de 1 mg/L de eugenol.

Comportamento semelhante foi apresentado por Mylonas *et al.* (2005), ao avaliarem o efeito do óleo de cravo no tempo de indução à anestesia profunda, em

duas espécies de peixes (*D. labrax* e *S. aurata*), a diferentes temperaturas (25°C e 15°C). Resultado ratificado pelos achados de Cunha e Rosa (2006) e por Okamoto *et al.* (2009), ao analisarem os efeitos do eugenol no tempo de indução à anestesia em sete espécies de peixes tropicais, e em juvenis do pampo (*T. marginatus*), respectivamente.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração. TM_{sed} apresentou comportamento crescente com aumentos expressivos no tempo de manutenção com o aumento da concentração anestésica, 1,59 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7223. TR_{sed} apresentou crescimento inicial crescente até a dosagem de 20 mg/L, onde o tempo de retorno foi máximo (29 minutos), e em seguida decrescente (FIGURA 13).

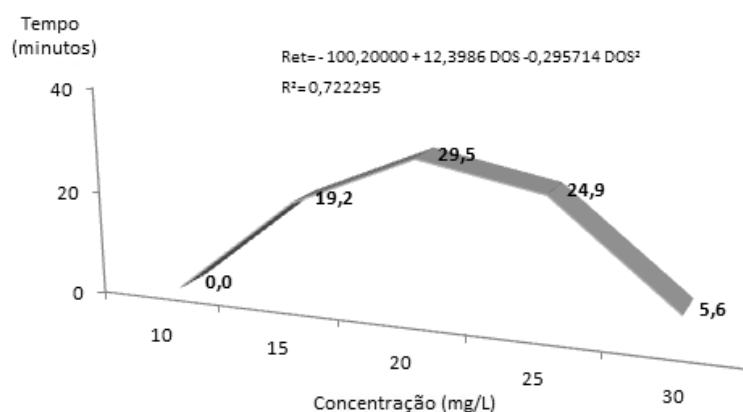


FIGURA 13 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 30 dias.

Possivelmente, a superestimação de T_5 tenha ocorrido devido ao ajustamento dos dados em razão da ausência de TR à sedação e à anestesia, uma vez que, todos os indivíduos vieram a óbito.

Mylonas *et al.* (2005), ao compararem a eficácia do óleo de cravo em duas espécies de peixes, o dourado (*Sparus aurata*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), em diferentes temperaturas, relataram que à 25°C, em ambas as espécies, TR apresentou comportamento decrescente, reduzindo com o aumento da dosagem utilizada.

Os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}), apresentaram o mesmo comportamento observado em TI_{sed} e em TI_{ane} na faixa etária de 15 dias, e por outros autores, como citado anteriormente, ou seja, tendência a estabilidade.

Talvez, a estabilização do tempo de indução tenha ocorrido devido à metodologia adotada, se os intervalos entre as observações tivessem sido menores (inferior a 15 minutos), possivelmente o comportamento observado seria de redução de TI com o aumento da dosagem.

Os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. O ponto de curvatura mínima, que indica o início de aumentos expressivos no tempo de manutenção à anestesia, ocorreu na dosagem de 14,07 mg/L, (FIGURA 14). A partir da concentração de 17,20 mg/L (ponto de curvatura máximo) TM_{ane} começa a estabilizar, indicando que aumentos na concentração de eugenol não levam a melhoras significativas no tempo de manutenção.

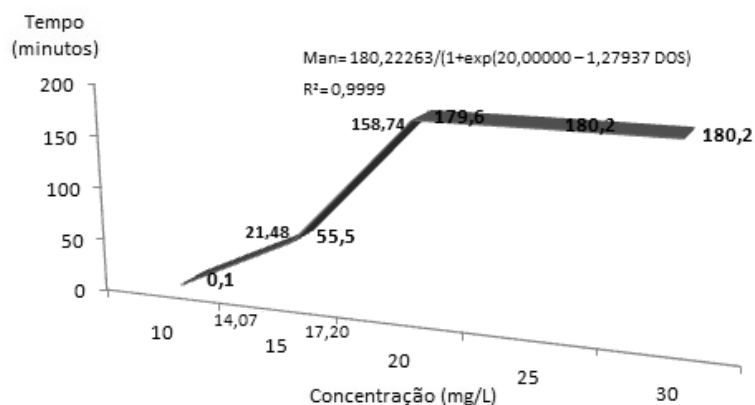


FIGURA 14 – Valores ajustados pela regressão do tempo manutenção à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,6495. TR_{sed} apresentou crescimento inicial crescente até a dosagem de 20 mg/L, onde o tempo de retorno foi máximo (25 minutos), e em seguida decrescente (FIGURA 15).

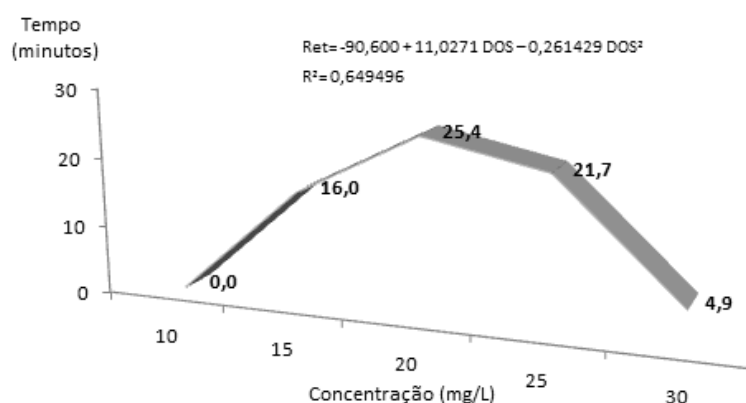


FIGURA 15 – Valores ajustados pela regressão dos tempos retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias.

Todavia, nos tratamentos finais (T_4 e T_5) os valores obtidos pelo modelo de regressão não condizem com os valores médios obtidos. Possivelmente, a subestimação de T_4 e a superestimação de T_5 tenham ocorrido devido ao ajustamento dos dados em razão da ausência de TR à anestesia no tratamento T_5 , uma vez que, todos os indivíduos vieram a óbito. Se desconsiderarmos os dois últimos valores obtidos (T_4 e T_5), considerando-os como erro de ajustamento, e adotarmos os valores médios observados 30 ± 1 min e 0min (100% de óbito) teremos que o tempo de retorno à sedação aumenta com o aumento da dosagem utilizada até a dosagem de 20 mg/L e em seguida tende à estabilização. Tempos de retorno constantes, independentes da concentração anestésica utilizada, foram reportados por Vidal *et al.* (2007b), ao avaliarem a eficiência do eugenol na anestesia de juvenis de piavuçu (*L. macrocephalus*) e por Valente (2009) ao observar os efeitos de três anestésicos (benzocaína, eugenol e mentol) na indução anestésica de espécimes adultos de piavuçu (*L. macrocephalus*) e curimbatá (*P. lineatus*).

5.1.1.3. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L(T_1), 15 mg/L (T_2), 20 mg/L (T_3), 25 mg/L (T_4) e 30 mg/L (T_5) de eugenol.

Nos tratamentos T_1 e T_2 , apenas a sedação foi alcançada, após em média 9 ± 8 min e 17 ± 5 min de imersão em solução anestésica em 60% e 100% dos girinos, respectivamente. A manutenção do estado sedado, no tratamento T_1 foi mantida por um período mínimo de 45 minutos (três casos) e máximo de 180 minutos (dois casos), sendo o tempo médio de manutenção de 57min. Na concentração seguinte

(15 mg/L), o tempo médio de manutenção foi de 177 ± 9 min. O retorno dos animais ao estado normal, nos tratamentos T_1 e T_2 ocorreram após 3 ± 3 min e 14 ± 5 min de imersão em água livre de anestésico, respectivamente. O baixo valor obtido para o retorno dos animais na concentração de 10 mg/L ocorreu em função do número reduzido de animais que permaneceram sedados por 180min e necessitaram ser colocados em água pura para o completo restabelecimento (dois casos), indicando a baixa eficiência dessa dosagem para sedação dos girinos de rã-touro por um período superior à 57min.

Nas concentrações seguintes, a sedação ocorreu após 15 ± 2 min de imersão, em 100% dos girinos, estado mantido por 178 ± 2 min. O tempo de retorno à sedação variou entre 15min (33,33%) e 90min (3,33%), sendo o tempo médio de retorno de 20 ± 7 min, 33 ± 14 min e 45 ± 26 min, para os tratamentos T_3 , T_4 e T_5 , respectivamente.

A anestesia foi observada a partir de T_3 . Porém, nessa dosagem apenas quatro animais (40%) alcançaram este estágio anestésico após um período médio de exposição ao óleo de cravo de 75 ± 35 min. O pequeno número de indivíduos anestesiados e o grande período de tempo necessário para a indução anestésica indicam a baixa eficiência dessa dosagem para a indução à anestesia de girinos na faixa etária de 45 dias.

Nas dosagens de 25 mg/L e 30 mg/L, 100% da população amostral encontravam-se anestesiados após 56 ± 10 min e 15 ± 1 min de imersão em solução anestésica, respectivamente. Estado mantido em ambos os casos por um período de 180 minutos e com a recuperação de todos os animais após 20 ± 10 min (T_4) e 36 ± 18 min (T_5) de imersão em água livre de anestésico.

Os valores ajustados dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Valores ajustados dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
10	10	57	2	-	-	-
15	14	177	12	-	-	-
20	16	180	23	75	72	7
25	16	180	33	56	179	19
30	14	180	44	15	181	36

O tempo de indução à sedação (TI_{sed}) ajustado pela regressão apresentou comportamento inicial crescente (0,40 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol), estabilizando nas dosagem de 20 mg/L e 25 mg/L, e em seguida decrescente, indicando que aumentos na dosagem de óleo de cravo levam a redução do tempo de indução à sedação (0,36 min/mg/L).

Resultados que corroboram com os obtidos foram relatados para reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) induzidos à anestesia por meio de imersão em óleo de cravo (OLIVEIRA, 2009).

Valente (2009), entretanto, ao avaliar o uso de três anestésicos, entre eles o óleo de cravo, a benzocaína e o mentol, em três espécies de peixes em idade reprodutiva (piavuçu, curimbatá e trairão), relatou a independência entre as variáveis

TI e concentração anestésica. Segundo o autor, em reprodutores de piavuçu e curimatá, induzidos à anestesia profunda por meio de aspersão branquial de eugenol e benzocaína (piavuçu), e por mentol, benzocaína e óleo de cravo (curimatá), o tempo de indução apresentou valores constantes independente da dosagem anestésica utilizada.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. De acordo com o modelo, na concentração de 12,86 mg/L (ponto de curvatura máximo) TM_{sed} começa a estabilizar. Assim, o tempo de manutenção à sedação nos tratamentos T_2 , T_3 , T_4 e T_5 não apresentam diferenças significativas entre si.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9861. TR_{sed} apresentou comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a aumentos expressivos no tempo de retorno (2,07min/mg/L de óleo de cravo) (FIGURA 16).

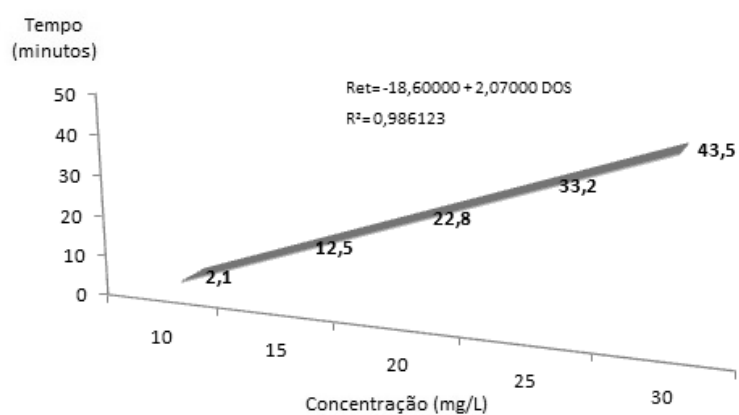


FIGURA 16 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias.

Nos tratamentos T₁ (10 mg/L de eugenol) e T₂ (15 mg/L de eugenol), os tempos de indução à anestesia ajustados pela regressão foram superestimados, enquanto que no tratamento T₃ (20 mg/L de eugenol), os mesmos foram subestimados. Uma hipótese para explicar o ocorrido seria o número reduzido da população amostral que, nessas concentrações, atingiram o estado de anestesia (0% em T₁; 0% em T₂; 40% em T₃), em razão da baixa dosagem anestésica utilizada. Assim, em virtude do ajustamento dos dados devido a não indução à anestesia de parcela representativa da população e da grande variação nos tempos de indução, os valores estimados não condizem com os valores observados em laboratório. O que explica o baixo valor de R² obtido pelo modelo de regressão (R²= 0,3345).

Considerando os valores médios observados em TI, tem-se que este diminui à medida que se aumenta a concentração de eugenol. Trabalhos que corroboram com este resultado, em que o aumento da dosagem anestésica leva a redução do tempo de indução, foram relatados por Neu *et al.* (2009), em juvenis de carpa comum (*C. carpio*); Coppola *et al.* (2008), em alevinos de lambari (*A. altiparanae*) e Park *et al.* (2008), em juvenis de garoupa (*E. bruneus*).

Os tempos de indução à anestesia observados e as respectivas frequências relativas, por tratamento, estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 14 – Tempo de indução à anestesia, em minutos, e as respectivas freqüência relativas, em porcentagem, em função das concentrações de eugenol utilizada

Tratamentos	Tempo de retorno (minutos)	Frequência (%)
T ₁ (10 mg/L)	0	100
T ₂ (15 mg/L)	0	100
T ₃ (20 mg/L)	45	20
	105	20
T ₄ (25 mg/L)	30	10
	45	10
	60	80
T ₅ (30 mg/L)	15	100

De acordo com o modelo de regressão, os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) apresentaram comportamento crescente até a dosagem de 22,46 mg/L (33,79 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol) e em seguida tendência à estabilização. Assim, a partir dessa dosagem TM_{ane} apresenta valores constantes independente da concentração anestésica utilizada.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9985. TR_{ane} apresentou comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a aumentos expressivos no tempo de retorno (3min/ mg/L de eugenol) (FIGURA 17).

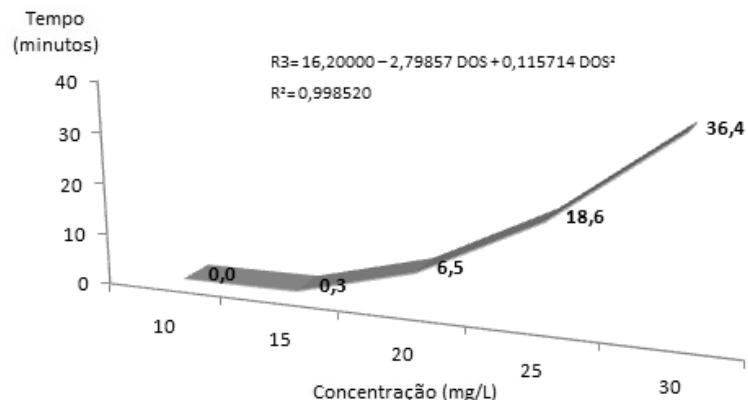


FIGURA 17 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias.

Trabalhos que ratificam os resultados obtidos foram reportados por Okamoto *et al.* (2009), em juvenis do pampo (*T. marginatus*); Coppola *et al.* (2008), em alevinos de lambari (*A. altiparanae*) e Park *et al.* (2008), em juvenis de garoupa (*E. bruneus*).

5.1.1.4. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 15 mg/L (T₁), 20 mg/L (T₂), 25 mg/L (T₃), 30 mg/L (T₄) e 35 mg/L (T₅) de eugenol.

No tratamento T₁, apenas a sedação foi alcançada possivelmente em razão da baixa dosagem anestésica utilizada. Após 15min (70%) a 30min (30%) de imersão em solução anestésica, 100% dos animais imersos não apresentavam reflexo de fuga. A sedação foi mantida por um período médio de 116 ± 23min, por 40% da população amostral que não necessitaram ser imersos em água pura para o

completo restabelecimento do comportamento normal, enquanto que, os demais (60%) mantiveram-se sedados por um período de 180 minutos e foram colocados em água livre de anestésico para o retorno ao estado normal. Nestes animais, o tempo de recuperação médio foi de 9 ± 8 min.

No tratamento T_2 , a sedação assim como em T_1 , ocorreu após um período de 20 ± 7 min de imersão, em 100% da população amostral. A anestesia, não observada em T_1 , foi constatada em 40% dos girinos imersos. Supõe-se que a não indução de parcela representativa da população (acima de 60%) tenha ocorrido devido à baixa dosagem anestésica utilizada, anestesiando apenas os indivíduos mais sensíveis à ação do eugenol.

Nos demais tratamentos (T_3 , T_4 e T_5) a sedação dos girinos foi constatada após 16 ± 4 min de imersão, porém, o tempo de indução necessário para que os girinos perdessem completamente o sentido de nocicepção (anestesia), variou de acordo com a dosagem de eugenol utilizada. Em T_3 , o tempo médio necessário foi de 47 ± 5 min (100% da população), enquanto que, em T_4 o tempo de indução variou entre 15min (60%) e 30min (40%), e em T_5 , o tempo médio observado foi de 16 ± 3 min. A manutenção tanto do estado sedado quanto do anestesiado, nestes três tratamentos, foi de 180 minutos em 100% dos casos.

Na dosagem de 25 mg/L (T_3), os tempos médios de retorno à anestesia e à sedação foram respectivamente de 23 ± 24 min e 24 ± 28 min. Em T_4 (30 mg/L) e T_5 (35mg/L), os tempos de retorno à anestesia e à sedação variaram entre 30 e 45 minutos e 30 e 120 minutos, no primeiro caso, e, no segundo caso, entre 45 e 90 minutos e 75 a 180 minutos. Nestas concentrações foram observadas o não retorno (óbito) de 60% (T_4) e 50% (T_5) dos animais imersos. Uma vez que, uma parcela

representativa da população amostral foi a óbito, supõe-se que isso tenha ocorrido devido à dosagem elevada de anestésico utilizada ou ao tempo excessivo de exposição.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, ajustados pela regressão em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 – Valores ajustados dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia, em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
15	20	155	6	-	-	-
20	19	180	12	24	72	6
25	17	180	37	35	179	21
30	16	180	60	31	181	22
35	15	180	90	12	181	22

No tratamento T₂ (20 mg/L de eugenol), os tempos de indução, manutenção e retorno à anestesia foram subestimados pela equação de regressão, provavelmente em razão do pequeno número de animais induzidos à anestesia (quatro animais) e a grande variância encontrada nas respostas à indução anestésica (TI, TM e TR) desses animais.

Embora alguns valores ajustados, principalmente os iniciais, tenham diferido do observado experimentalmente, muitas vezes subestimando esses valores, o

comportamento estimado pela regressão se ajusta adequadamente ao comportamento observado experimentalmente.

Nesta faixa etária, os tempos de indução (TI_{sed}) à sedação ajustaram-se a um modelo linear decrescente, indicando que aumentos na dosagem anestésica levam a redução do tempo de indução (0,27min/mg/L de eugenol).

Comportamento semelhante ao obtido para TI (linear decrescente) foi relatado para tilápias em idade reprodutiva durante a indução anestésica por meio de imersão em óleo de cravo (OLIVEIRA, 2009).

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não-linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. De acordo com este modelo, o ponto de curvatura mínima, que indica o início de aumentos expressivos no tempo de manutenção, ocorreu na dosagem de 12,38 mg/L. A partir desse ponto até a dosagem de 15,14 mg/L (ponto de curvatura máxima) o tempo de manutenção à sedação apresenta uma taxa de aumento de 49,79 minutos para cada acréscimo de 1 mg/L de eugenol. Todavia, acima do ponto de curvatura máxima (15 mg/L) TM_{sed} passa a apresentar comportamento constante, de modo que aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de manutenção à sedação.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo não-linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9281. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 26,09 mg/L, indicando o início de aumentos expressivos no tempo de retorno à sedação, 8,91 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol (FIGURA 18).

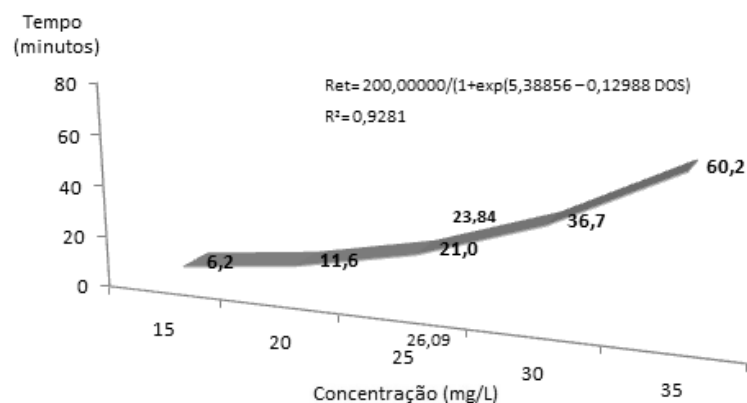


FIGURA 18 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias.

Trabalhos que ratificam os resultados obtidos foram reportados para juvenis de pintado (*P. corruscans*) induzidos à anestesia profunda por meio de imersão em eugenol (VIDAL *et al.*, 2006).

Os tempos de indução à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração. TR_{ane} apresentou comportamento inicial crescente até a dosagem de 25 mg/L (ponto de máximo), onde o tempo de indução a anestesia foi de 34,7 minutos, e em seguida decrescente, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a redução do tempo de indução.

Logo, a partir de T_3 (25 mg/L), onde 100% da população amostral foram induzidos à anestesia, a taxa de redução no tempo de retorno foi de 2,26 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol.

Os tempos de manutenção (TM_{ane}) e retorno (TR_{ane}) à anestesia ajustaram-se a um modelo não linear sigmoide simples em resposta à variação da

concentração. No primeiro caso (TM_{ane}), o ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 18,38 mg/L, indicando o início de aumentos expressivos no tempo de manutenção (33,81 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol) e o ponto curvatura máxima na concentração de 22,46 mg/L, indicando o início da estabilização de TM_{ane} . Assim, a partir desse ponto o tempo de manutenção a anestesia passa a apresentar comportamento constante independente da dosagem de eugenol utilizada. Em TR_{ane} , o ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 18,87 mg/L e o ponto curvatura máxima, na concentração de 23,06 mg/L, indicando que a partir desse ponto aumentos na concentração de eugenol não levam a alterações significativas no tempo de retorno à anestesia, sendo este constante e igual a 22 minutos.

DELBON (2006), ao avaliar os efeitos fisiológicos de diferentes dosagens de óleo de cravo (40, 60, 80 e 100 mg/L), em juvenis de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), não observou diferenças estatísticas no tempo de recuperação dos mesmos.

VIDAL *et al.* (2006) ao exporem juvenis de pintado (*P. corruscans*) às concentrações de 25, 50, 75, 100 mg/L de eugenol, durante 10 minutos, concluíram que os tempos de retorno à posição normal e à reação à captura, não apresentaram diferenças estatísticas até a concentração de 75 mg/L. Todavia, Woody *et al.* (2002) ao avaliarem os efeitos do óleo de cravo em espécimes adultos de salmão (*Oncorhynchus nerka*), relataram a existência de diferenças estatísticas quanto ao tempo de recuperação dos peixes na dosagem de 140 mg/L em comparação às de 20 mg/L e 50 mg/L.

5.1..5. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 20 mg/L (T_1), 25 mg/L (T_2), 30 mg/L (T_3), 35 mg/L (T_4) e 40 mg/L (T_5) de eugenol.

Em todas as concentrações avaliadas tanto a sedação quanto a anestesia foram constatadas logo no primeiro tratamento, em 100% da população amostral. Os tempos médios de indução à sedação nas cinco dosagens avaliadas foram de 15 ± 1 min. A anestesia nos tratamentos T_1 e T_2 foram observadas após 56 ± 10 min e 23 ± 8 min de imersão, respectivamente, e nos demais tratamentos após 15 minutos.

A sedação assim como a anestesia foi mantida por 180 minutos, com o restabelecimento do comportamento normal de 76% da população amostral sedada e anestesiada após 58 ± 29 min e 38 ± 16 min de imersão em água livre de anestésico, respectivamente.

Os tempos de retorno à anestesia e à sedação em T_1 , variaram de 15 min (80%) a 45 min (10%) e de 15 min (20%) a 60 min (10%) de imersão em água livre de anestésico, respectivamente. No tratamento T_2 , o tempo mínimo necessário para o retorno à anestesia foi de 15 minutos (10%) e o máximo de 60 minutos (20%) enquanto que, para a sedação os tempos mínimos e máximos foram, respectivamente, de 15 min e 90 min de imersão em água pura (livre de anestésico). Nas dosagens de 30 mg/L (T_3) e 35 mg/L (T_4), o retorno à anestesia e à sedação ocorreram após 74 ± 24 min (TR_{sed} em T_3) e 45 ± 10 min (TR_{ane} em T_3), e 57 ± 42 min (TR_{sed} em T_4) e 38 ± 23 min (TR_{ane} em T_4) de imersão em água pura, respectivamente. Na dosagem seguinte (40 mg/L), apenas 10% dos animais (um animal) restabeleceram o comportamento normal após 105 minutos, os demais

vieram a óbito. Possivelmente, isso tenha ocorrido devido à dosagem elevada de anestésico utilizada ou ao tempo excessivo de exposição. Talvez, em razão da natureza persistente do óleo de cravo este tenha se aderido à superfície das brânquias dos girinos, dificultando sua eliminação, e conseqüentemente, aumentado o tempo efetivo de exposição, levando-os ao colapso.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia, em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
20	15	180	30	53	180	19
25	15	180	62	28	180	42
30	15	180	70	14	180	47
35	15	180	54	11	180	35
40	15	180	-	17	180	-

Nesta faixa etária, os tempos de indução e manutenção à sedação foram constantes e iguais a 15 e 180 minutos, respectivamente.

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos foram reportados por Tort *et al.* (2002) e Inoue *et al.* (2003), ao avaliarem o uso de diferentes concentrações de óleo de cravo na indução à anestesia de juvenis de dourado (*Sparus aurata*) e de truta (*Oncorhynchus mykiss*), e em juvenis de matrinxã (*Brycon*

cephalus), respectivamente. Os autores, de ambos os trabalhos, concluíram que não houve diferenças significativas nos tempos de indução nas espécies avaliadas.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9556. TR_{sed} apresentou comportamento inicial crescente, com ganhos expressivos até a dosagem de 30 mg/L (FIGURA 19), e em seguida decrescente, o que não observado na prática.

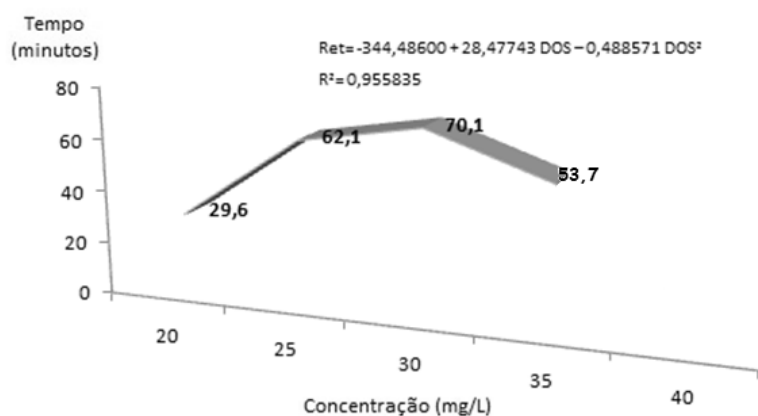


FIGURA 19 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de eugenol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Possivelmente, os valores obtidos foram subestimados pelo modelo de regressão devido à redução do tamanho amostral em T_5 (apenas uma informação), uma vez que, o número de animais que não retornaram ao estado normal passa a ser representativo (90%) e, conseqüentemente, aumentando o erro amostral.

Se levarmos em conta apenas o tempo médio dos indivíduos que restabeleceram o comportamento normal, desconsiderando os que vieram a óbito,

em que $TR = 0$ min, o comportamento apresentado pelo tempo de retorno passa a ser unicamente crescente (FIGURA 20).

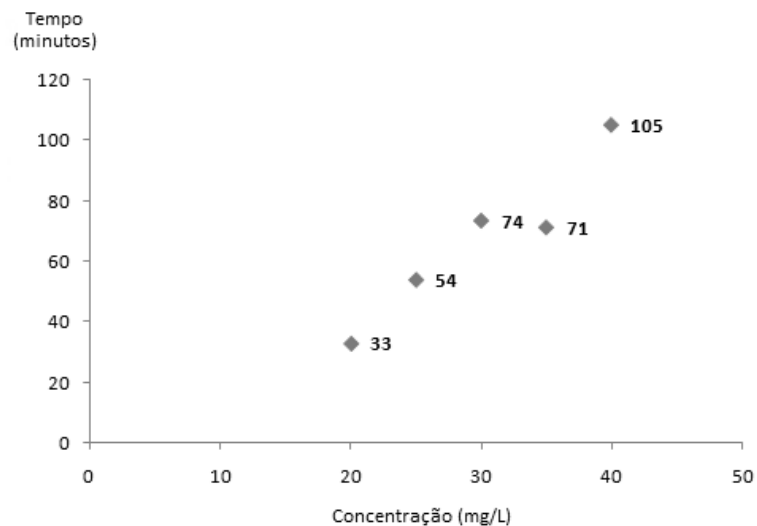


FIGURA 20 – Tempo médio do restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias, em função da concentração de eugenol.

De acordo com o modelo de regressão, os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}) apresentaram comportamento decrescente indicando que aumentos na concentração anestésica levam a redução do tempo de indução (1,77 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol).

Do mesmo modo como observado na sedação, os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) foram constantes em todos os tratamentos e iguais a 180 minutos.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9900. TR_{ane} apresentou comportamento inicial crescente, indicando aumentos expressivos no tempo de retorno à anestesia com o aumento da concentração anestésica (2,79 min/mg/L) até

a dosagem de 30 mg/L, e, em seguida, decrescente (FIGURA 21), assim como ocorreu no retorno à sedação.

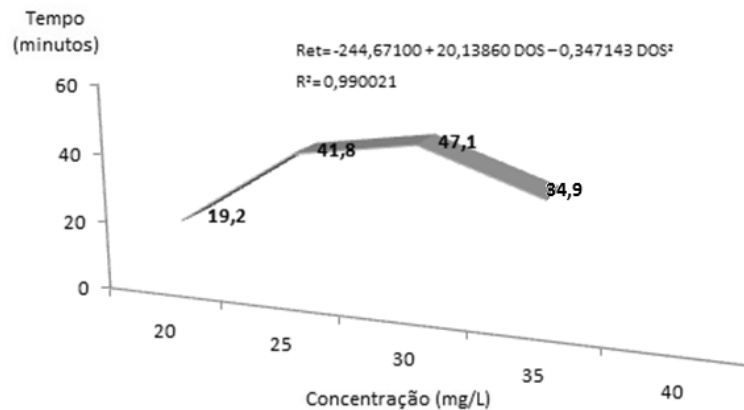


FIGURA 21 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de eugenol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Se levarmos em conta apenas o tempo médio dos indivíduos que restabeleceram o comportamento normal (80% em T_4 e 10% em T_5), desconsiderando os que não se recuperam da anestesia, em que $TR = 0$ min, o comportamento apresentado pelo tempo de retorno passa a ser inicialmente crescente, nas dosagens iniciais com tendência a estabilização nas dosagens maiores (FIGURA 22). Assim, a partir de 25 mg/L a recuperação anestésica é pouco ou não influenciada pelas diferentes concentrações.

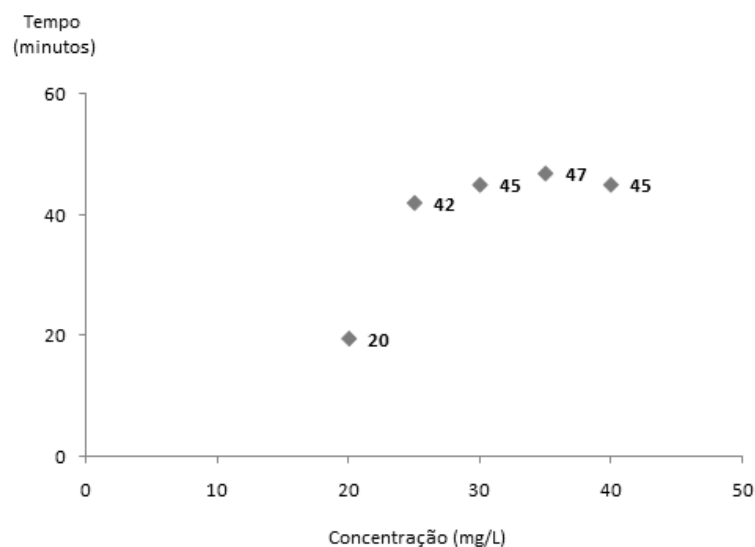


FIGURA 22 – Tempo médio de recuperação à anestesia em função da concentração de eugenol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Diversos autores constataram não só a redução do tempo de indução com o aumento da concentração anestésica como também a menor influência das concentrações na recuperação dos animais (INOUE *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2007).

Ao observar os gráficos apresentados dos tempos de indução (TI) e retorno (TR), em função da concentração, nota-se que estes apresentaram comportamentos semelhantes nas diferentes faixas etárias. Em todas as faixas etárias avaliadas o tempo de retorno à sedação correlacionou-se positivamente com a concentração. Segundo Mylonas *et al.* (2005), em geral, longos períodos de exposição a um anestésicos resultam em aumento no tempo de recuperação dos animais e assim, dosagens menores apresentariam TR maiores pois necessitariam de um período maior de exposição para se alcançar o estágio anestésico desejado.

Todavia, neste trabalho independente da dosagem utilizada e do estágio anestésico alcançado todos os animais permaneceram imersos em solução anestésica por um período de 180 minutos, assim, supõe-se que o aumento de TR esteja relacionado ao aumento da concentração anestésica.

Park *et al.* (2008) ao avaliarem a eficiência anestésica do eugenol em juvenis de garoupa (*Epinephelus bruneus*) verificaram que o aumento da concentrações desse anestésico resultava na redução do tempo de indução e incremento no tempo de recuperação. Resultados análogos foram reportados para alevinos de lambari (*Astyanax altiparanae*) e juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*), de dourado (*Salminus brasiliensis*) e de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (da SILVA *et al.*, 2009; OKAMOTO *et al.*, 2009; COPPOLA *et al.*, 2008; HISANO *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2006).

Em juvenis de carpa comum (*Cyprinus carpio*), e de jundiá (*Rhamdia quelen*), o tempo de retorno foi independente das concentrações anestésicas, não sendo constatada nenhuma diferença significativa no tempo de recuperação nas diferentes dosagens avaliadas (NEU *et al.*, 2009; CUNHA, 2007).

Em todas as faixas etárias, com exceção das de 45 e 60 dias de idade, observou-se o aumento do tempo de indução à anestesia, nas concentrações iniciais, com tendência à estabilidade nas últimas. O oposto foi relatado para juvenis de *Oreochromis niloticus*, de *Brycon cephalus*, *Sparus aurata* e de *Leporinus macrocephalus* (VIDAL *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2007a; VIDAL *et al.*, 2007b; INOUE, 2005; MYLONAS *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2003). De acordo com os autores, nas concentrações iniciais houve queda no tempo de indução e, em seguida, nas concentrações finais, tendência a estabilidade.

Nas faixas etárias de 30, 45 e 60 dias de idade, o tempo de indução à sedação reduziu como aumento da concentração anestésica, indicando que nas dosagens iniciais foram necessários maiores tempos de exposição ao anestésico para a sedação dos mesmos. Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos foram relatados por Mylonas *et al.* (2005), Vidal *et al.* (2007a), Park *et al.* (2008), Okamoto *et al.* (2009), Neu *et al.* (2009), Bittencurt *et al.* (2009). Todavia, nas faixas etárias de 15 e 75 dias de idade, TI foi constante independente da concentração utilizada. Possivelmente, isso tenha ocorrido devido à maior fragilidade dos animais nessas faixas etárias, uma vez que, aos 15 dias idade, os girinos acabam de sair da fase embrionária e estão mais susceptíveis a qualquer alteração do meio, e aos 75 dias, em razão das inúmeras alterações fisiológicas que irão culminar no clímax da metamorfose e a conversão de animais onívoros e aquáticos em animais carnívoros e terrestres.

Embora o uso de anestésicos seja amplamente utilizado no manejo e transporte de diversas espécies de peixes (KING *et al.*, 2005), em anfíbios anuras são poucos os relatos com respeito a esse assunto, e mais raros ainda os que avaliam o uso de anestésicos em girinos.

Assim, com base na avaliação de 1200 girinos, de 15 a 75 dias de idade, estipulou-se a primeira recomendação para sedação e anestesia de girinos de rã-touro (TABELA 17).

TABELA 17 – Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações seguras, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), de acordo com a faixa etária, em dias

Parâmetros	Faixa etária (dias)				
	15	30	45	60	75
Sedação					
Concentração (mg/L)	15	10 a 20	15 a 20	15 a 20	20 a 30
Indução (min)	13	23 a 14	14 a 16	20	15
Manutenção (min)	142	152 a 167	177 a 180	155 a 180	180
Retorno (min)	14	0 a 29	12 a 23	6 a 12	30 a 70
Anestesia					
Concentração (mg/L)	20	20 a 25	25	25	20 a 30
Indução (min)	15	15	29	35	53 a 14
Manutenção (min)	111	180	179	179	180
Retorno (min)	15	20	19	21	19 a 47

Nas concentrações recomendadas para a sedação, no mínimo 80% da população amostral apresentou ausência de reflexo de fuga e perda total de equilíbrio, com o restabelecimento do comportamento normal sem qualquer alteração visível. Já, nas concentrações recomendadas para a anestesia, 100% da população amostral apresentou ausência de reflexo de fuga, perda total de equilíbrio e ausência de resposta a estímulo nocivo, além de, 100% de retorno ao estado normal.

Castro *et al.* (2010), de acordo com os tempos de indução e retorno, número de animais induzidos à sedação e a taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro,

nas faixas etárias de 30, 45 e 60 dias, concluíram que o eugenol é um anestésico eficaz para a sedação, podendo ser utilizado não só no transporte destes animais como também em atividades de manejo.

Na literatura são encontradas diferentes recomendações para diferentes espécies de peixes, sendo alguns bastante próximos aos encontrados neste trabalho para girinos de rã-touro. Neu *et al.* (2009) e Vidal *et al.* (2007b) recomendam a dosagem de 37,5 mg/L de eugenol para a indução anestésica de juvenis de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), respectivamente. Concentração similar (40 mg/L) foi recomendada para a anestesia de juvenis de *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* (MYLONAS *et al.*, 2005). Hisano *et al.* (2008) classificam o óleo de cravo como um anestésico seguro para juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*), quando utilizado entre 40 mg/L a 60 mg/L.

Okamoto *et al.* (2009) e da Silva *et al.* (2009) recomendam a dose de 50 mg/L para indução anestésica de juvenis do pampo (*T. marginatus*) e de lambari (*A. altiparanae*). Resultados que se encontram dentro do intervalo de valores, frequentemente, obtidos para outras espécies variam de 25 mg/L a 150 mg/L (WOODY *et al.*, 2002; GRUSH *et al.*, 2004; ROUBACH *et al.*, 2005; HAJEK *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CUNHA, 2007; VIDAL *et al.*, 2008; COPPOLA *et al.*, 2008). Cook *et al.* (2004), no entanto, recomendam concentrações bem menores, de 5 mg/L a 9 mg/L, como sendo ideais para transporte de juvenis de *Micropterus salmonides*.

5.1.2. Mentol

Assim como descrito anteriormente, para o eugenol, em todos os testes realizados e em todas as faixas etárias a reação dos girinos de rã-touro, ao primeiro contato com o anestésico, foi de hiperatividade.

A hiperatividade inicial, em função do uso do mentol, foi também observada em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), piavuçú (*Leporinus macrocephalus*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e trairão (*Hoplias lacerdae*) (VALENTE, 2009; OLIVEIRA, 2009).

Após a hiperatividade inicial, o comportamento dos girinos seguiu o mesmo padrão observado pelos animais imersos em eugenol.

5.1.2.1. Faixa Etária: 15 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 20 mg/L (T₁), 25 mg/L (T₂), 30 mg/L (T₃), 35 mg/L (T₄) e 40 mg/L (T₅) de mentol.

Em todas as dosagens avaliadas 100% dos animais imersos em solução anestésica encontravam-se sedados após 19 ± 14 min de imersão. Nos tratamentos T₁, T₂ e T₃, o estado de sedação foi mantido por um período mínimo de 105 minutos e máximo de 180 minutos, sendo o tempo médio de manutenção à sedação (TM_{sed}) de 151 ± 32 min. Dentre os animais sedados por 180 minutos (43% da população amostral), a recuperação, caracterizada pelo restabelecimento do comportamento normal, foi observada após 15 de imersão em água livre de anestésico (período de recuperação) em 100% dos casos. Nos tratamentos seguintes (35 mg/L e 40 mg/L), 100% dos animais permaneceram sedados por 180 minutos e o restabelecimento do

comportamento normal, ou seja, a resposta imediata a estímulos externos, ocorreu após um período de 15min (mínimo) a 135min (máximo) sendo que, o tempo médio de recuperação (TR_{sed}) foi de 82 ± 62 min (65% da população amostral). A partir do tratamento T_4 em que foi observado o óbito de 30% dos girinos expostos ao mentol, constatou-se o aumento do número de óbitos com o aumento da dosagem anestésica (40% de óbito em T_5 e 70% de óbito na dosagem de 45 mg/L, concentração excluída devido à grande mortalidade observada).

Uma vez que a literatura referente ao uso de mentol visando à indução anestésica em vertebrados é escassa e é, ainda, desconhecida os mecanismos fisiológicos envolvidos na ação do mentol, possivelmente a mortalidade dos girinos pode estar associada à exposição demasiadamente longa ou ao próprio anestésico.

Uma terceira hipótese seria lise celular em razão de alterações iônicas resultantes do uso do mentol. Diversos trabalhos têm demonstrado a existência de interação negativa entre o uso de anestésicos e parâmetros sanguíneos e hematológicos como, por exemplo, cortisol circulante, glicose plasmática, número de eritrócitos e taxa de hemoglobina, os quais são indicativos de estresse agudo (GOMES et al., 2001; BOLASINA, 2006). Sartore *et al.* (2007), ao avaliarem o uso de mentol no transporte de alevinos de piaçu (*Leporinus macrocephalus*), constataram que a imersão dos peixes em 8 mg/L de mentol implicou em morte rápida dos animais. A hipótese formulada pelos autores, para explicar a alta mortalidade encontrada, foi de lise celular resultante do aumento intracelular do íon potássio (K^+).

Façanha e Gomes (2005), ao avaliarem a eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), verificaram

aumentos significativos do íon potássio no plasma dos peixes expostos a concentrações superiores a 50 mg/L, e associaram a mortalidade encontrada a esses aumentos, que teriam resultado no rompimento das células dos animais anestesiados por meio de mentol.

Nos tratamentos T₁ e T₂, a anestesia foi alcançada por apenas 20% dos animais (dois animais em cada tratamento), após 15 minutos de imersão, condição mantida por um período de 176 ± 8min, com o restabelecimento do sentido de nocicepção após 15 minutos de imersão em água livre de anestésico.

Assim, uma vez que, a anestesia não foi alcançada por no mínimo 60% da população amostral e que não houve variações significativas de peso, tamanho e idade entre os animais induzidos à anestesia, supõe-se que os animais que atingiram esse estágio se tratassem de indivíduos mais sensíveis ao mentol ou debilitados, ou seja, animais estressados, exaustos ou enfraquecidos, devido principalmente a variabilidade fisiológica do próprio indivíduo, visto que, todos os animais utilizados foram provenientes da mesma desova e criados no mesmo local e sob as mesmas condições de manejo sanitário, profilático e alimentar (ração com 36% PB, ad libitum). Assim, acredita-se que se houve diferenças entre os animais, com respeito à estado de saúde e/ou nível de estresse, provavelmente, essas variações são próprias do indivíduo, devido à variabilidade fisiológica intra-específica.

Nos demais tratamentos, 100% dos animais encontravam-se anestesiados após 15 minutos de imersão em solução anestésica, estado mantido por no máximo 75 minutos, em T₃ (TM_{médio}= 60 ± 22min), e 180 minutos, em T₄ e T₅. O retorno à anestesia nesses tratamentos ocorreu após 58 ± 52min de imersão em água pura,

ou seja, água livre de anestésico. Possivelmente, no tratamento T₃, a manutenção à anestesia por curto período de tempo tenha ocorrido em razão da baixa dosagem anestésica utilizada.

Os valores ajustados pela regressão para as variáveis tempo de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – Valores ajustados dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
20	21	138	-	-	-	-
25	21	154	-	-	-	-
30	19	166	14	13	98	-
35	17	174	49	16	141	29
40	14	180	55	15	185	37

Resultados que corroboram com os obtidos quanto ao tempo de indução à sedação foram reportados por Gonçalves *et al.* (2008) ao avaliarem o uso de diferentes concentrações de mentol (50, 100, 150 e 200 mg/L) na indução anestésica de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em substituição à benzocaína. De acordo como os autores, nas concentrações iniciais o tempo de indução à sedação (estágio 2, segundo WOODY *et al.* 2002), foram significativamente maiores do que as finais. Todavia, Façanha e Gomes (2005), ao avaliarem a eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma*

macropomum), observaram que o tempo de indução à perda de reação a estímulos foi semelhante em todas as concentrações avaliadas, não existindo diferenças estatísticas no tempo de indução à sedação com o aumento da dosagem de mentol.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8386. TM_{sed} apresentou comportamento crescente com aumentos expressivos no tempo de manutenção à sedação com o aumento da concentração anestésica (2,09 min/mg/L de mentol). Todavia, a partir da dosagem de 30 mg/L (ponto de curvatura máximo) o tempo de manutenção começa a estabilizar passando a apresentar comportamento constante (FIGURA 23). Possivelmente, a estabilização tenha ocorrido em razão da metodologia adotada, em que foi estipulado o tempo máximo de exposição aos anestésicos de 180 minutos. Porém, a manutenção dos animais por um período superior ao estabelecido parece inviável em razão do provável aumento da mortalidade, observada a partir de T_4 .

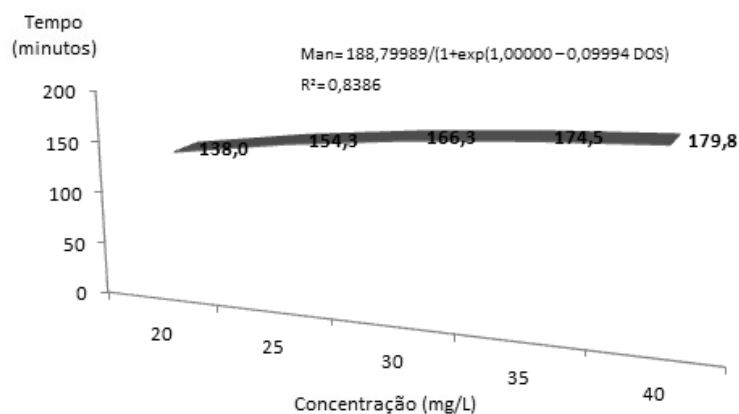


FIGURA 23 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}), em função da concentração de mentol, apresentaram comportamento crescente com aumentos expressivos a partir da dosagem de 28,51 mg/L (6,62 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) e tendência à estabilização após a dosagem de 35,84 mg/L. A partir desse ponto, o tempo necessário para o restabelecimento do comportamento normal foi semelhante em todas as concentrações avaliadas, não existindo diferenças estatísticas no tempo de retorno à sedação com o aumento da dosagem de mentol.

Comportamento semelhante foi observado para os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}). Segundo o modelo de regressão (não linear sigmoidal simples, $R^2 = 0,9741$), a partir da dosagem de 30 mg/L, ponto em que o mentol passa a induzir uma parcela representativa da população à anestesia, não houve diferenças significativas nos tempos de indução com o aumento da concentração anestésica.

Resultados que corroboram com os obtidos foram relatados por Valente (2009) e Oliveira (2009), ao avaliarem o uso de mentol na indução anestésica de reprodutores de curimbatá (*P. lineatus*), por meio de aspensão nas brânquias, e em reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*) e de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), por meio de imersão, respectivamente.

Os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8552. TM_{ane} apresentou comportamento crescente com ganhos expressivos no tempo de manutenção com o aumento da concentração anestésica (8,67 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) (FIGURA 24).

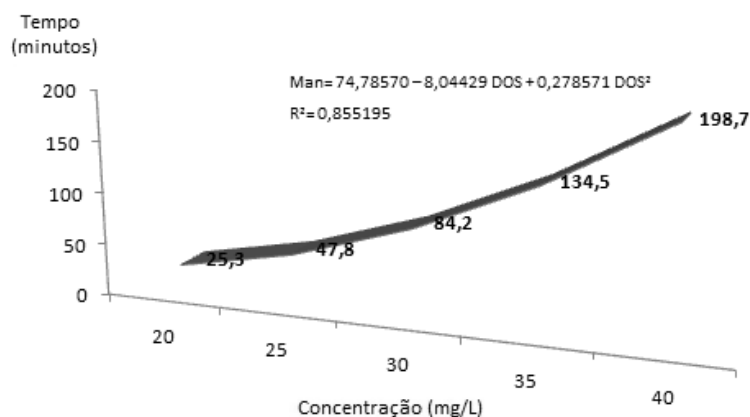


FIGURA 24 – Valores ajustados pela regressão do tempo manutenção à anestesia em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Assim como observado em TR_{sed} , os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) apresentaram tendência à estabilização nas últimas concentrações. De acordo com o modelo de regressão ajustado, após a dosagem de 36,48 mg/L ($TR_{ane} = 33,55$ minutos) não houve diferenças estatísticas significativas no tempo de retorno à anestesia com o aumento da dosagem de mentol. Assim, a partir da dosagem em que a anestesia é alcançada (35 mg/L, $TR_{ane} = 29$ min) até a estabilização do tempo de retorno (36,48 mg/L), TR_{ane} apresentou um aumento de 3,07 minutos para cada acréscimo de 1 mg/L de mentol.

No tratamento T_3 , o tempo de indução à sedação ajustado foi superior ao de anestesia, devido à presença de 10% da população amostral sedada apenas após 75 minutos, aumentando o tempo médio de sedação (21 ± 19 min), e que não foram induzidos à anestesia.

5.1.2.2. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de mentol.

Nas dosagens iniciais (10 mg/L, 15 mg/L e 20 mg/L), a sedação ocorreu após um período mínimo de 15 minutos e máximo de 45 minutos de imersão em solução anestésica. Nesses tratamentos, os tempos médios necessários para a sedação foram, respectivamente, de 15 ± 7min, 18 ± 9min e 17 ± 5min. O estado sedado foi mantido por no mínimo 75 minutos, e o tempo médio de manutenção foi 142 ± 41min. A necessidade de exposição à água pura, ou seja, livre de anestésico para o restabelecimento do comportamento normal dos animais sedados foi necessário apenas em 20% dos casos (seis animais sedados em trinta expostos). Dentro desse grupo, o tempo médio de recuperação foi 19 ± 7min.

Houve apenas um caso, no tratamento T₂, em que o girino, mesmo após 180 minutos de exposição à solução de mentol, não apresentou nenhum indício de sedação. Possivelmente, em razão da variação individual (genética) esse animal fosse mais resistente a ação do mentol, necessitando de dosagens maiores para a sedação. Todavia, como se tratou de apenas um indivíduo (10%), não envolvendo parcela representativa da população (no mínimo 60%) o ocorrido foi considerado como um fato isolado, e conseqüentemente, não representativo da população.

Nos demais tratamentos (T₄ e T₅), a sedação foi induzida após 15 minutos de exposição ao mentol, condição mantida por 180 minutos, em ambos os tratamentos. O retorno à sedação em T₄ ocorreu após um período de 15min a 30min de imersão em água pura, em 80% e 20% da amostra, respectivamente.

A anestesia alcançada somente a partir de T₄ (25 mg/L) ocorreu após um período de imersão de 33 ± 37min, estado foi mantido por no mínimo 165 minutos, com o tempo médio de manutenção de 176 ± 7min. Nessa concentração a recuperação dos animais ocorreu sem a necessidade do período de retorno (imersão dos animais em água pura), uma vez que, passados o prazo de 180 minutos de imersão em solução anestésica, todos os girinos anestesiados já apresentavam resposta a estímulos nocivos ou nociceptivos, permanecendo apenas sedados, ou seja, sem reflexo de fuga.

No tratamento T₅ (30 mg/L), os tempos médios de indução e manutenção à anestesia foram, respectivamente, de 81 ± 19min e 179 ± 1min. Porém, apenas 10% dos animais retornaram da sedação e da anestesia, após um período de 150min e 135min de imersão em água livre de mentol, respectivamente, ocorrendo o óbito de 90% dos animais avaliados. Possivelmente a mortalidade dos girinos pode estar associada à exposição demasiadamente longa, à dosagem anestésica elevada ou à lise celular em razão de alterações iônicas resultantes do uso do mentol (aumento intracelular de íons K⁺).

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia em função da concentração de anestésico, estão apresentados na Tabela 19.

TABELA 19 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
10	15	135	-	-	-	-
15	17	146	-	-	-	-
20	17	157	-	-	-	-
25	16	168	11	33	102	-
30	15	179	18	81	180	-

Nesta faixa etária, não houve diferenças expressivas nos tempo de indução à sedação (TI_{sed}) com o aumento da concentração. Todavia, observou-se que a partir da dosagem de 25 mg/L, TI_{sed} passou a apresentar tendência à estabilização, com o tempo médio de 15 minutos.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo linear crescente em resposta à variação da concentração, com aumentos expressivos no tempo de manutenção com o aumento da concentração (2,22 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol).

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo raiz quadrada crescente, indicando que aumentos na concentração anestésica levam à incrementos em TR_{sed} .

Trabalhos que ratificam os resultados obtidos foram relatados por Façanha e Gomes (2005), ao avaliarem os eventos comportamentais de juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) expostos a diferentes concentrações de mentol (50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L e 250 mg/L). Padrões semelhantes (TR quadrático

crescente) foram, também, relatados para reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*), anestesiados por meio de benzocaína e eugenol, e para reprodutores de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) induzidos à anestesia por meio de óleo de cravo (OLIVEIRA, 2009).

Os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9904. TI_{ane} apresentou comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração anestésica levam a aumentos expressivos no tempo de indução (5,37 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) (FIGURA 25).

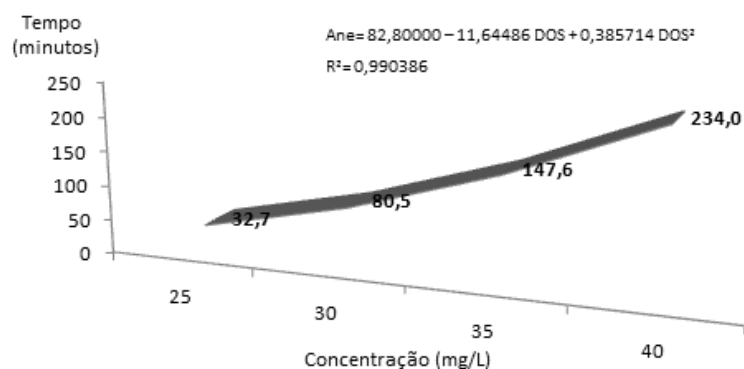


FIGURA 25 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 30 dias.

Gonçalves *et al.* (2008), ao avaliarem os tempos de indução à anestesia de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*), em quatro concentrações crescentes de mentol (50, 100, 150 e 200 mg/L), observaram que embora não ocorressem diferenças estatísticas em TI, nas concentrações de 100 a 200 mg/L, os tempos necessários para a perda total do equilíbrio e dos estímulos, aumentaram com o aumento da dosagem anestésica.

Resultados semelhantes foram reportados por Façanha e Gomes (2005), ao avaliarem os efeitos de cinco dosagens crescentes de mentol (50, 100, 150, 200 e 250 mg/L), em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*), onde os autores observaram que embora não ocorressem diferenças estatísticas em TI, nas concentrações de 50 a 100 mg/L e de 150 a 250 mg/L, os tempos necessários para a perda total do equilíbrio e dos estímulos, aumentaram com o aumento da dosagem anestésica.

Os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9891. De acordo com este modelo, na concentração de 27,19 mg/L ocorreu o ponto de curvatura máximo, que indica o início da estabilização do tempo de manutenção. Assim, a partir desse ponto, em que TM_{ane} foi de 161 minutos, aumentos na concentração de mentol não levam à alterações significativas no tempo de manutenção à anestesia (FIGURA 26).

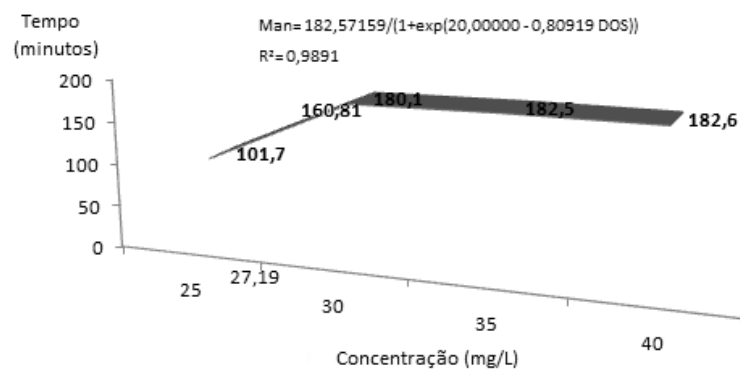


FIGURA 26 – Valores ajustados pela regressão do tempo manutenção à anestesia, em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias.

Nesta faixa etária, o tempo de retorno à anestesia não foi estabelecido devido a três fatores: a não indução à anestesia nos tratamentos iniciais (T₁, T₂ e T₃); o restabelecimento do comportamento normal dos animais anestesiados no tratamento T₄ sem a necessidade do período de recuperação (imersão em água pura), a partir do qual se cronometrava o tempo necessário para a recuperação; e o não retorno (óbito) de 90% da população amostral no tratamento T₅.

5.1.2.2. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 20 mg/L (T₁), 25 mg/L (T₂), 30 mg/L (T₃), 35 mg/L (T₄) e 40 mg/L (T₅) de mentol.

Com exceção do tratamento T₁, em que após 15 minutos de exposição ao mentol, 90% da população amostral não apresentava reflexo de fuga, nos demais tratamentos avaliados, após o mesmo período de exposição, todos os animais amostrados (100%) apresentavam-se sedados.

Em T₁, a sedação foi mantida por no mínimo 75 minutos (10% dos animais amostrados) e por no máximo 180 minutos. Nessa dosagem, houve apenas um caso em que o animal alocado em solução anestésica não apresentou perda de reflexo de fuga, durante todo o período experimental, e apenas 67% dos girinos sedados necessitaram ser colocados em água pura (seis indivíduos em nove no total), ou seja, livre de anestésico, para o restabelecimento do comportamento normal, comportamento obtido após 15 minutos de imersão. Supõe-se, que esses quatro girinos, dos quais um não foi afetado pelo mentol e os outros três que ficaram

sedados, em média, por apenas 115min, fossem indivíduos mais resistentes à ação do anestésico em razão de variações individuais ou intra-específicas.

No tratamento T₂, a sedação dos girinos amostrados foi mantida por um período de 180 minutos, com o restabelecimento do comportamento normal após 15 a 30 minutos de imersão em água livre de anestésico. Nessa concentração apenas 20% dos animais alcançaram o estado de anestesia, condição mantida por 180 minutos. O restabelecimento do reflexo nociceptivo, ou seja, o retorno à anestesia desses dois animais foi observado após um período de recuperação de 30 minutos. A não indução à anestesia de parcela representativa da população (60% ou mais), provavelmente, tenha ocorrido em função da baixa dosagem anestésica utilizada.

Nos tratamentos seguintes (T₃, T₄ e T₅), todos os girinos amostrados encontravam-se anestesiados após 120 minutos de imersão em solução de mentol, estado mantido por 180 minutos. Nos dois primeiros tratamentos (T₃ e T₄), o retorno à anestesia, em 100% dos casos, ocorreu após um período médio de 28 ± 16 min de imersão em água pura, enquanto que, no tratamento T₅ (40 mg/L), apenas 40% dos animais, induzidos à anestesia, restabeleceram o sentido de nocicepção. O óbito de parcela representativa da população (60%) indica que, provavelmente, o tempo de exposição ao anestésico tenha sido demasiadamente longo, aprofundando a anestesia em demasia e, conseqüentemente, levado os animais ao colapso. Uma segunda explicação seria a lise celular, em função de alterações iônicas intracelulares, principalmente de íons K⁺, causadas pela ação do mentol, que pode ter resultado na intoxicação e morte dos animais.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 20.

TABELA 20 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
20	14	143	-	-	-	-
25	15	180	26	-	-	-
30	15	180	36	120	180	22
35	15	180	43	120	180	25
40	15	180	49	120	180	25

Embora os tempos de indução à sedação (TI_{sed}) tenham se ajustado a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração ($R^2= 0,8571$), nas dosagens avaliadas, TI_{sed} apresentou comportamento praticamente constante (0,05 min/mg/L de mentol), não apresentando diferenças significativas ao longo dos tratamentos.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. Segundo o qual, a partir da dosagem de 20,62 mg/L, em que TM_{sed} foi de 159min, aumentos na concentração de mentol não levam à alterações significativas nos tempos de manutenção.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a aumentos no tempo de retorno, em média, 1,53 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol.

A partir do tratamento T₃ (30 mg/L), em que a anestesia é alcançada, os tempos de indução à anestesia (T_{I_{ane}}) assim como os de manutenção (T_{M_{ane}}) foram constantes, independente da dosagem de mentol utilizada (T_{I_{ane}}= 120min; T_{M_{ane}}= 180min).

Os tempos de retorno à anestesia (T_{R_{ane}}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. De acordo com o modelo, a partir da dosagem de 30 mg/L, em que T_{R_{ane}} foi de 22min, aumentos na concentração de mentol não levam à alterações significativas nos tempos de retorno.

5.1.3.1. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 20 mg/L (T₁), 30 mg/L (T₂), 40 mg/L (T₃), 50 mg/L (T₄) e 60 mg/L (T₅) de mentol.

Em todos os tratamentos avaliados, todos os animais amostrados encontravam-se sedados após 15 minutos de imersão em solução anestésica, ou seja, não apresentavam reflexo de fuga, condição mantida por no mínimo 90 minutos (2% dos animais avaliados) e no máximo 180 minutos (92% da população amostrada), o restante (6%) mantiveram-se sedados por 150 minutos. O retorno à sedação ocorreu após um período de 15min a 150min de imersão em água livre de anestésico, em 32% e 2% da população amostrada, respectivamente.

No tratamento T₁, 60% da população amostral foram colocadas em água pura para o restabelecimento do comportamento normal, o que ocorreu após 9 ± 8min do início do período de recuperação. Os 40% restantes recuperaram os sentidos

mesmo em solução anestésica após permanecerem sedados por, em média, 135 minutos. Uma vez que, uma parcela representativa da população não apresentou o mesmo comportamento (60% ou mais), supõe-se que estes se tratassem de animais mais resistentes à ação do fármaco (variação individual), permanecendo sedados por tempo menor.

A partir do tratamento T₂, os animais induzidos à sedação permaneceram sem apresentar reflexo de fuga por 180 minutos e observou-se o início da ausência de resposta a estímulos nociceptivos.

Nos tratamentos T₂ e T₃, a anestesia foi observada em 70% e 100% da população em estudo após 32 ± 22 min e 44 ± 5 min de imersão em solução anestésica, respectivamente. Condição mantida por 167 ± 5 min na dosagem de 30 mg/L (T₂), e por 180min em T₃ (40 mg/L). Nos tratamentos seguintes (T₄ e T₅), a anestesia de 100% dos animais foi obtida após 32 ± 5 min e 17 ± 5 min de imersão em solução anestésica, estado mantido em ambos os casos por 180 minutos.

O restabelecimento do sentido de nocicepção (retorno à anestesia) foi observado em 73% da população anestesiada, sendo observado o não retorno de 30% dos animais em T₃, 20% em T₄ e 30% em T₅.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 21.

TABELA 21 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
20	15	162	11	-	-	-
30	15	180	15	30	166	-
40	15	180	26	42	180	12
50	15	180	44	36	180	27
60	15	180	67	13	180	44

Os tempos de indução à sedação (TI_{sed}) foram constantes, independente das concentrações avaliadas (FIGURA 27).

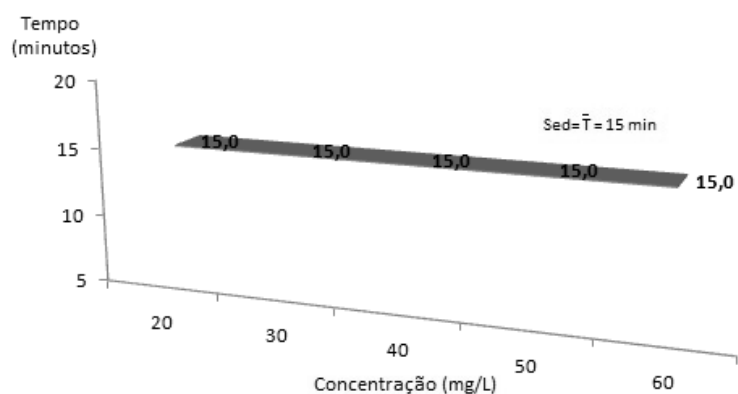


FIGURA 27 - Tempos de indução à sedação em função da concentração de mentol de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias.

Resultados que corroboram com o obtido foram relatados por Oliveira (2009) e Valente (2009) ao avaliarem os tempos de indução à anestesia por meio de

imersão e aspersão branquial de mentol em reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*) e de curimatá (*P. lineatus*), respectivamente.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não-linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. Segundo o modelo, a partir da concentração de 19,82 mg/L (ponto de curvatura máxima), em que TM_{sed} foi de 159 minutos, aumentos na concentração de mentol não levam à alterações significativas no tempo de manutenção à sedação. Logo, nos tratamentos avaliados não houve diferenças significativas no tempo de manutenção à sedação com o aumento da dosagem anestésica.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9704. TR_{sed} apresentou comportamento crescente indicando que aumentos na concentração de mentol levam a aumentos no tempo de recuperação (1,41 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) (FIGURA 28).

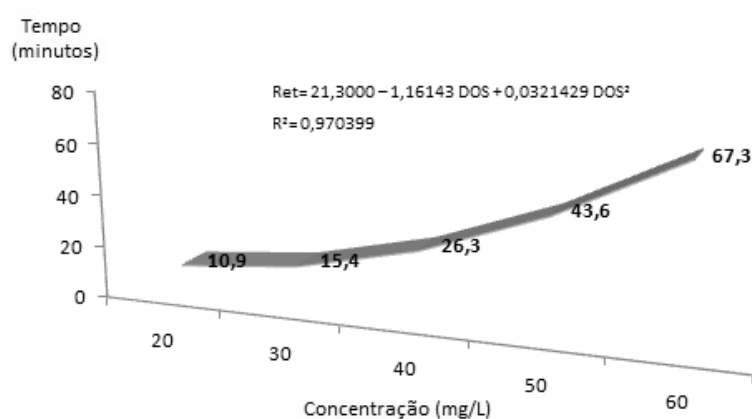


FIGURA 28 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 60 dias.

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos, em que aumentos na concentração anestésica levam a aumentos no tempo de recuperação, foram reportados por diversos autores não só para o mentol como também para a benzocaína, eugenol e outros compostos anestésicos não avaliados neste trabalho como quinaldina e MS-222, em *Pseudoplastystoma corruscans*, *Leporinus macrocephalus*, *Brycon cephalus*, *Epinephelus bruneus*, *Oreocromis niloticus* e *Piaractus brachypomus* (VIDA *et al.*, 2006; VIDA *et al.*, 2007a; VIDA *et al.*, 2007b; PARK *et al.*, 2008; VELASCO-SANTAMARIA *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009).

Os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9545. TI_{ane} apresentou comportamento inicial crescente até a dosagem de 40 mg/L (ponto de máximo), onde o tempo de indução a anestesia foi de 41,7 minutos, e em seguida decrescente indicando que aumentos na concentração de mentol levam a redução do tempo de indução (FIGURA 29). A partir de T_3 (40 mg/L), onde 100% dos girinos foram anestesiados, a taxa de redução em TI_{ane} foi de 1,46 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol.

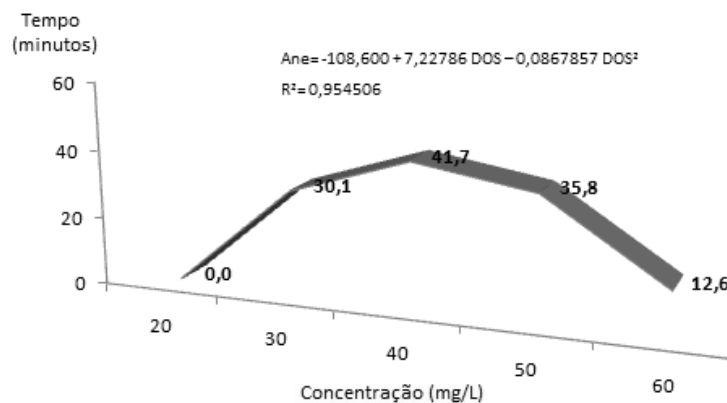


FIGURA 29 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 60 dias.

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos, em que se observou a ocorrência de correlação negativa entre concentração anestésica e tempo de indução, foram reportados por diversos autores para o mentol como também para a benzocaína e o óleo de cravo em diferentes espécies de peixes como, por exemplo, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Salminus brasiliensis*, *Brycon cephalus*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* (FAÇANHA e GOMES, 2005; VIDAL *et al.*, 2007a; HISANO *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2008; NEU *et al.*, 2009; BITTENCURT *et al.*, 2009).

Do mesmo modo como observado em TM_{sed} , os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, cujo ponto de máximo foi observado na dosagem de 29,33 mg/L, indicando o início da estabilização. Assim, a partir desse ponto aumentos na concentração de mentol não levam a alterações significativas no tempo de manutenção à anestesia.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração e, novamente, TR_{ane} apresentou comportamento crescente indicando que aumentos na concentração anestésica levam a aumentos no tempo de recuperação.

5.1.3.1. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 35 mg/L (T_1), 40 mg/L (T_2), 45 mg/L (T_3), 50 mg/L (T_4) e 55 mg/L (T_5) de mentol.

A sedação foi constatada desde o primeiro tratamento. Mas, no tratamento T_1 a ausência de reflexo de fuga foi alcançada por apenas 70% da população amostral, após 17 ± 22 min de imersão em solução anestésica. Nos demais tratamentos a sedação foi alcançada por 100% da população amostral após 21 ± 15 min de imersão.

A anestesia foi observada somente a partir de T_2 (40 mg/L), porém, em apenas 20% dos girinos (dois animais). A não indução de parcela representativa da população indica a baixa dosagem anestésica utilizada, não sendo ideal para a anestesia dos animais. Com o aumento de 5mg/L na concentração da solução anestésica 50% dos animais apresentaram ausência de resposta a estímulos nociceptivos (45 mg/L). Estado alcançado após 45 ± 51 min de imersão e mantido por 86 ± 91 min. Embora neste tratamento (T_3), 50% dos girinos tenham alcançado a anestesia, o longo tempo de indução e o curto tempo de manutenção indicam a baixa eficiência dessa dosagem na indução à anestesia.

Nos tratamentos T₄ e T₅, todos os girinos foram anestesiados após um período de 10min a 30min. Todavia, nessas dosagens, em ambos os casos, houve o óbito de 30% dos animais amostrados.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 22.

TABELA 22 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
35	20	73	-	-	-	-
40	20	157	10	-	-	-
45	19	178	15	32	100	-
50	18	180	15	28	149	7
55	17	180	15	11	180	13

Os tempos de indução à sedação (TI_{sed}) ajustaram-se a um modelo linear decrescente, indicando que aumentos na concentração de mentol levam a redução do tempo de indução (0,18 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) (FIGURA 30).

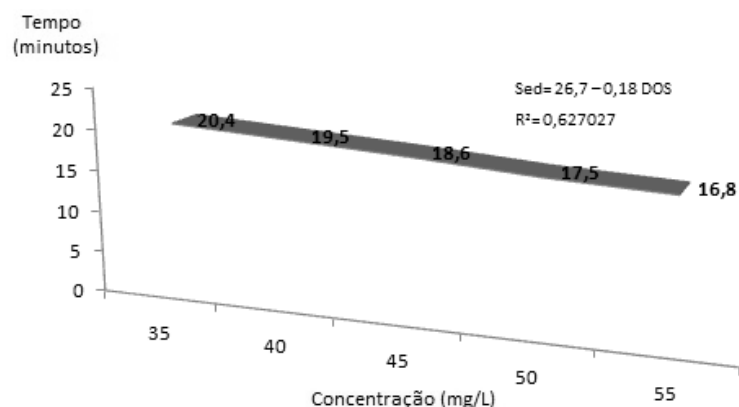


FIGURA 30 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 75 dias

Os tempos de manutenção (TM_{sed}) à sedação ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9993. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 31,39 mg/L ($TM_{sed} = 21,57$ minutos), indicando o início de ganhos expressivos no tempo de manutenção e o ponto de curvatura máxima na dosagem de 40,32 mg/L, indicando o início da estabilização. Assim, a partir desse ponto, aumentos na concentração de mentol não levam a alterações significativas no tempo de manutenção à sedação. Mas, entre os pontos de curvatura a taxa de aumento observada foi de 15,43 min/mg/L de mentol (FIGURA 31).

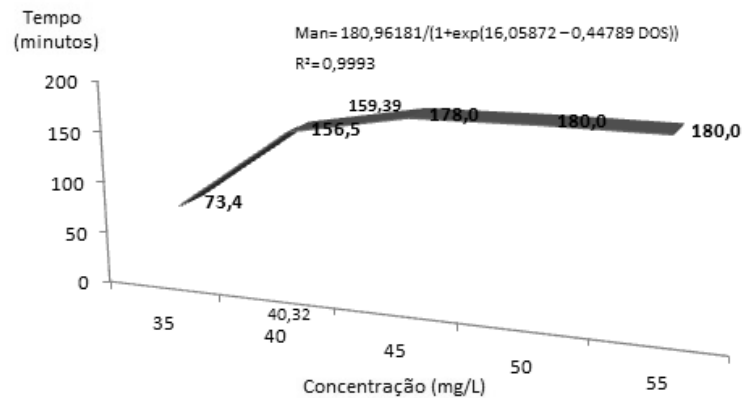


FIGURA 31 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na faixa etária de 75 dias.

Os tempos de retorno (TR_{sed}) à sedação ajustaram-se a um modelo não linear sigmoideal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7991. Nas concentrações iniciais TR_{sed} aumenta com o aumento da dosagem anestésica, e em seguida a partir de 45 mg/L, em que 100% da população amostral é sedada, passa a ser independente da dosagem, adquirindo valores constantes (FIGURA 32). Trabalhos que confirmam os resultados obtidos foram reportados por Valente (2009), ao avaliar o tempo de retorno de reprodutores de piavuçu e curimbatá anestesiados por meio de aspersão braquial com mentol, e por Oliveira (2009) ao avaliar a eficácia do mentol na anestesia de pacus e matrinxãs adultos. Neu *et al.* (2009) também relataram a independência entre TR e dosagem anestésica, em juvenis de carpa comum.

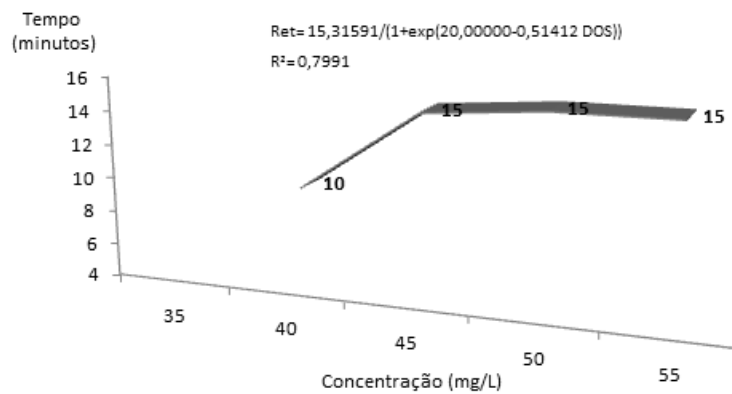


FIGURA 32 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à anestesia ajustaram-se a modelos quadrático em resposta à variação da concentração. Todavia, TI_{ane} apresentou comportamento decrescente indicando que aumentos na concentração de mentol levam a redução do tempo de indução à anestesia (2,19 min/mg/L de mentol) enquanto que TM_{ane} e TR_{ane} apresentaram comportamento crescente. As taxas de aumento nos tempos de manutenção e retorno foram, respectivamente, de 9 min/mg/L de mentol e de 1,33 min/mg/L de mentol (FIGURA 33).

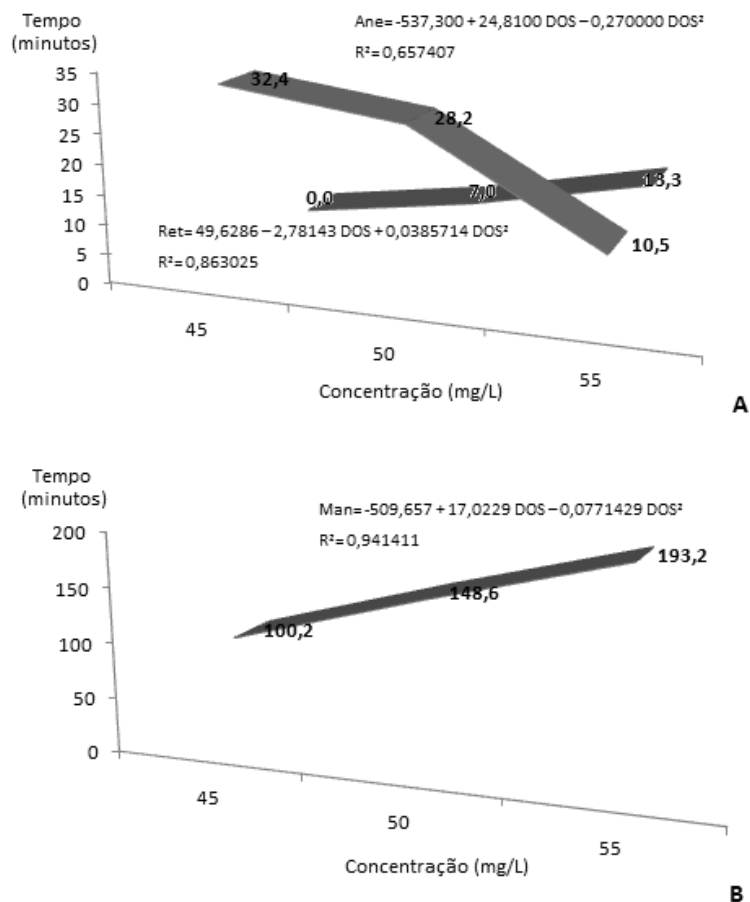


FIGURA 33 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução e retorno (A) e dos tempos de manutenção (B) à anestesia em função da concentração de mentol, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias

Ao observar os tempos de indução e retorno, tanto da sedação quanto da anestesia, de girinos de rã-touro, nas diferentes faixas etárias, nota-se claramente que os tempos de indução (TI) apresentam comportamentos opostos aos dos tempos de retorno (TR). TI diminui com o aumento da concentração, enquanto que TR aumenta.

Gonçalves *et al.* (2008), entretanto, ao avaliarem o uso de mentol em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), relataram o contrário. Segundo os autores, quanto

maior o tempo necessário para a indução anestésica, ou seja, menor a concentração utilizada, maior é o tempo necessário para a recuperação dos peixes.

Ostrensky *et al.* (2000) e Gomes *et al.* (2001), afirmam ainda que o tempo de recuperação, em peixes, é influenciado pelo tempo de exposição ao fármaco e pela temperatura. Porém, resultados reportados por Façanha e Gomes (2005), contradizem o relato anterior. Os autores avaliaram o efeito do tempo de exposição ao mentol no tempo de recuperação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Segundo os autores, o tempo de recuperação dos tambaquis independe do tempo de exposição ao anestésico até o limite testado de 30 minutos.

Nos experimentos realizados, a temperatura da solução em que os girinos foram alocados foi controlada durante todo o período experimental, de modo que, a temperatura fosse a mesma para todas as concentrações e em todas as faixas etárias. Assim, pode-se afirmar que a temperatura não influenciou os resultados.

Quanto ao tempo de exposição ao fármaco, neste trabalho, os girinos foram mantidos imersos por um período de 180 minutos, independente da concentração utilizada, e então retirados e alocados em água pura (água livre de anestésico) para recuperação, logo, não houve a influência do tempo de exposição nos tempos de retorno encontrados.

Em um estudo avaliando o uso de mentol como anestésico em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) relatou-se que a margem de segurança do mentol para uma exposição de 20 a 30 minutos é baixa, sendo o tempo máximo ideal para indução a anestesia de 10 minutos (SIMÕES e GOMES, 2009). Relatos semelhantes foram feitos por Ross e Ross (2008) e Roubach e Gomes (2001). Todavia, neste trabalho os girinos foram mantidos em solução anestésica por um

período de 180 minutos com o restabelecimento do comportamento normal sem qualquer alteração aparente.

Assim, uma vez que, não houve influência da temperatura e nem do período em que os animais foram mantidos em solução anestésica, acredita-se que a principal variável que poderia influenciar os tempos de indução, manutenção e retorno é a concentração.

Aparentemente, existem duas hipóteses possíveis para explicar as diferenças encontradas neste trabalho e os citados anteriormente. A primeira seria a variação entre as classes, visto que, existem diversos relatos informando a existência de diferenças não só no mecanismo de ação como também na duração do efeito anestésico, tanto entre quanto dentro de indivíduos da mesma espécie (Z AHL et al., 2009; LAFORTUNE et al., 2001).

Simões e Gomes (2008) ao avaliarem diferentes concentrações de mentol (50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L e 300 mg/L) em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) concluíram que para a biometria e manejo rápido, em que a sedação é suficiente, a concentração mais indicada é de 150 mg/L a 200 mg/L de mentol, enquanto que para a anestesia o ideal é de 250 mg/L. Façanha e Gomes (2005) ao avaliarem as mesmas concentrações em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) relataram que, para a sedação e a anestesia, as concentrações ideais, respectivamente, são de 100 mg/L e 150 mg/L de mentol. Gonçalves et al. (2008) e Anzileiro et al. (2008) relataram que a concentração ideal para anestésiar juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) é de 100 mg/L de mentol.

A segunda hipótese seria a metodologia experimental utilizada. Nos trabalhos citados anteriormente, os animais eram passados para água pura logo após a confirmação da anestesia, o que não ocorreu no presente estudo.

As concentrações mais indicadas para sedação e anestesia de girinos de rã-touro, nas diferentes faixas etárias, encontram-se na Tabela 23.

TABELA 23 – Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações mais indicadas, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), de acordo com a faixa etária, em dias

Parâmetros	Faixa etária (dias)				
	15	30	45	60	75
	Sedação				
Concentração (mg/L)	20 a 25	10 a 20	20	20	40
Indução (min)	21	15 a 17	14	15	20
Manutenção (min)	138 a 154	135 a 157	143	162	157
Retorno (min)	-	-	-	11	20
	Anestesia				
Concentração (mg/L)	30	25	30	30	45
Indução (min)	13	33	120	30	32
Manutenção (min)	98	102	180	166	100
Retorno (min)	-	-	22	-	-

Nas concentrações recomendadas para a sedação, 100% da amostra induzida apresentou ausência de reflexo de fuga e perda total de equilíbrio, com o restabelecimento do comportamento normal sem qualquer alteração visível. Nas

concentrações recomendadas para a anestesia, mais de 70% da amostra apresentava ausência de reflexo de fuga, perda total de equilíbrio e ausência de resposta a estímulo nocivo e 100% de retorno ao estado normal.

5.1.3. Benzocaína

Assim como descrito anteriormente, em todos os testes realizados e em todas as faixas etárias avaliadas, a reação dos girinos de rã-touro, ao primeiro contato com o anestésico, foi de hiperatividade, caracterizada pela rápida movimentação na cuba.

A hiperatividade inicial, em função do uso da benzocaína, foi relatada por Valente (2009) e Oliveira (2009), ao avaliarem os efeitos da benzocaína em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e em reprodutores de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e trairão (*Hoplias lacerdae*), respectivamente.

Após a hiperatividade inicial, o comportamento dos girinos seguiu o mesmo padrão observado para o eugenol e o mentol, ou seja, natação lenta; estagnação dos animais, em que a natação só foi observada após estímulo externo (vibração da água e/ou leve movimentação das cubas e pinçada leve na base da cauda), ausência total dos movimentos; parada dos animais em decúbito dorsal e, em alguns casos, na posição lateral.

5.1.3.1. Faixa Etária: 15 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de benzocaína.

Com exceção do primeiro tratamento, onde a sedação não foi alcançada por nenhum dos indivíduos alocados em solução anestésica, nos demais tratamentos a sedação ocorreu após 15 minutos de indução e mantida por um período de 150 ± 56min (tratamento T₂) a 180min (tratamentos T₃, T₄ e T₅).

A anestesia foi observada a partir do tratamento T₃ (20 mg/L), após um período médio de imersão em solução anestésica de 15 minutos. No tratamento T₃, com exceção de um indivíduo que retornou do estado anestésico sem a necessidade do período de recuperação (imersão em água livre de benzocaína), os demais se restabeleceram após 18 ± 9min de imersão em água pura. Nos tratamentos T₄ e T₅, 90% dos girinos restabeleceram o comportamento normal após 20 ± 15min e 53 ± 48min de imersão em água pura, respectivamente. Possivelmente, a morte de 10% dos animais (um indivíduo) em ambos os tratamentos tenha ocorrido em razão maior sensibilidade destes à benzocaína, uma vez que, uma parcela representativa da população amostral, sob as mesmas condições de manejo, se recuperou sem qualquer problema aparente, apresentando natação normal e resposta a estímulos externos logo após a recuperação.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração utilizada, estão apresentados na Tabela 24.

TABELA 24 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
10	-	-	-	-	-	-
15	15	150	6	-	-	-
20	15	180	14	14	172	10
25	15	180	28	15	180	18
30	15	180	48	15	180	23

A partir de T_2 , onde foi verificada a sedação dos animais, os tempos de indução à sedação (TI_{sed}) foram constantes independente da concentração utilizada.

Vidal *et al.* (2007a; 2007b; 2008), na indução anestésica de *L. macrocephalus*, *B. cephalus* e *O. niloticus*, respectivamente, observaram também a tendência a estabilidade de TI nas dosagens finais, embora nas dosagens iniciais os autores tenham constatado queda elevada no tempo de indução.

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 12,49 mg/L, indicando o início de aumentos expressivos no tempo de manutenção e o ponto de curvatura máximo na concentração de 15,27 mg/L, indicando o início da estabilização. A partir desse ponto aumentos na concentração de benzocaína não levam a alterações significativas no tempo de manutenção à sedação (FIGURA 34).

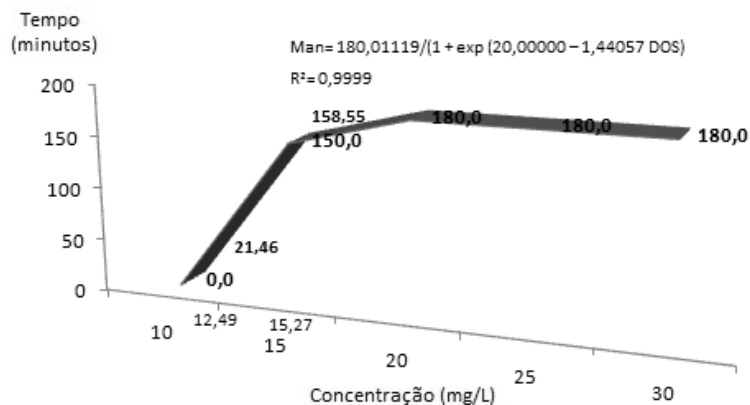


FIGURA 34 – Valores ajustados pela regressão dos tempos manutenção à sedação em função da concentração de benzocaína de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 15 dias.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a aumentos no tempo retorno (2,83min/mg/L de benzocaína).

Velasco-Santamaria *et al.* (2008) e Okamoto *et al.* (2009), ao avaliarem os efeitos da benzocaína em juvenis de *Piaractus brachypomus* e de *Trachinotus marginatus*, respectivamente, observaram, também, a existência de correlação positiva entre tempo de recuperação e dosagem anestésica.

Assim como observado anteriormente em TM_{sed} , os tempos de indução (TI_{ane}), manutenção (TM_{ane}) e retorno à anestesia (TR_{ane}) também se ajustaram a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. De acordo com os modelos ajustados pela regressão, os pontos de curvatura máximo de TI_{ane} , TM_{ane} e TR_{ane} ocorreram, respectivamente, nas dosagens de 19,27 mg/L, 19,31 mg/L e 27,90 mg/L, indicando o início da estabilidade. Logo, a partir

dessas dosagens aumentos na concentração de benzocaína não levam a alterações significativas nos tempos de indução, manutenção e retorno à anestesia.

5.1.3.2. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 30 mg/L (T₁), 35 mg/L (T₂), 40 mg/L (T₃), 45 mg/L (T₄) e 50 mg/L (T₅) de benzocaína.

Em todos os tratamentos avaliados a ausência de reflexo de fuga (sedação) foi constatada após 15 minutos de imersão em solução anestésica, e em 100% da população amostral.

A anestesia, no entanto não foi observada no tratamento T₁ e nos demais tratamentos iniciais (T₂ a T₄) apenas uma pequena parcela da população alcançou esse estágio, provavelmente em função da baixa concentração anestésica utilizada. Em T₂ e em T₃, apenas um único indivíduo, em cada um dos tratamentos, apresentou ausência do sentido de nocicepção, após 105min e 75min de imersão em solução anestésica, respectivamente, e em ambos os casos, os girinos vieram a óbito após 180 minutos de imersão. Na concentração seguinte (45 mg/L de benzocaína), o estado de anestesia foi observado em dois animais (20% da população amostral), após 83 ± 74 min de imersão. Em ambos os casos, os girinos permaneceram anestesiados por 180 minutos e após um período de recuperação de 3 horas, em água livre de anestésico, os mesmos não restabeleceram o sentido de nocicepção. Porém, após 12 horas de recuperação foi constatado que os animais estavam vivos e apresentavam comportamento normal (reflexo de fuga e nocicepção). Uma vez que, tanto no tratamento T₂ quanto nos tratamentos T₃ e T₄ a

anestesia não foi alcançada por uma parcela representativa da população, supõe-se que a dosagem utilizada tenha sido baixa para esse fim e que, provavelmente, os animais induzindo à anestesia fossem indivíduos com maior sensibilidade a ação do fármaco (variabilidade individual).

No tratamento T₅ (50mg/L), a anestesia foi alcançada por 100% da população amostral após 114 ± 25min, condição mantida por um período de 180 minutos. Embora a anestesia tenha sido alcançada de forma eficaz, apenas 30% dos girinos anestesiados restabeleceram o reflexo de nocicepção e o comportamento normal, após 105 ± 54min e 115 ± 61min de imersão em água pura (livre de anestésico), respectivamente.

De acordo com o que fora descrito nos métodos, a menor concentração determinada deveria induzir à sedação no mínimo 10% dos animais e a máxima induzir 100% dos animais tanto à sedação quanto à anestesia, excluindo-se as dosagens que levassem a óbito mais de 50% dos girinos. Entretanto, embora o tratamento T₅ tenha induzido a óbito 70% dos girinos, essa concentração foi selecionada por ser a única induzir mais de 50% dos animais à anestesia, estado não atingido nas dosagens anteriores.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 25.

TABELA 25 – Valores ajustados dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e os tempos médios de indução, manutenção e retorno à anestesia, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias, expostos a concentrações crescentes de benzocaína

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
30	15	180	20	-	-	-
35	15	180	23	-	-	-
40	15	180	20	-	-	-
45	15	180	83	-	-	-
50	15	180	115	115	180	105

Nesta faixa etária, os tempos de indução (TI_{sed}) e manutenção (TM_{sed}) à sedação foram constantes e independentes da dosagem anestésica utilizada

Em razão da grande variação dos dados observados, não foi possível determinar um modelo que representasse de forma adequada o tempo de retorno à sedação.

Porém, considerando os tempos médios de recuperação de cada tratamento, foi obtida uma curva com padrão crescente, que indica que aumentos na concentração anestésica levam a incrementos no tempo de retorno (FIGURA 36).

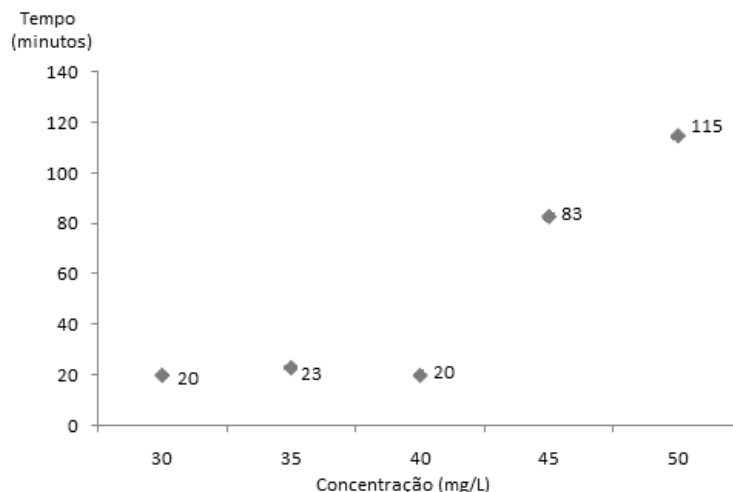


FIGURA 36 – Valores médios dos tempos de retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias.

Trabalhos que ratificam os resultados observados foram relatados por Okamoto *et al.* (2009) e por Oliveira (2009) ao avaliarem o uso de benzocaína na anestesia de juvenis do pampo (*T. marginatus*) e de reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*).

Conforme exposto anteriormente, com exceção do tratamento T₅, nos demais tratamentos a anestesia não foi alcançada por parcela representativa da população, de modo que não foi possível estabelecer um modelo que representasse de forma adequada os dados obtidos. Assim, adotou-se os tempos médios observados nos tratamentos.

5.1.3.3. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 45 mg/L (T₁), 50 mg/L (T₂), 55 mg/L (T₃), 60 mg/L (T₄) e 65 mg/L (T₅).

Em todos os tratamentos avaliados, 100% dos girinos foram sedados após 15 minutos de imersão, estado que se manteve durante 180 minutos. A anestesia foi observada a partir de T₂, onde 70% dos girinos foram anestesiados após 15 minutos de imersão, estado mantido por 99 ± 7min. Nos demais tratamentos a anestesia manteve-se por um período médio de 180 minutos.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 27.

TABELA 27 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
45	15	180	15	-	-	-
50	15	180	15	15	104	-
55	15	180	15	15	168	15
60	15	180	15	15	192	15
65	15	180	15	15	176	15

Nesta faixa etária, os tempos de indução (TI_{sed}), de manutenção (TM_{sed}) e de retorno (TR_{sed}) à sedação foram constantes, independente da concentração anestésica utilizada (FIGURA 37).

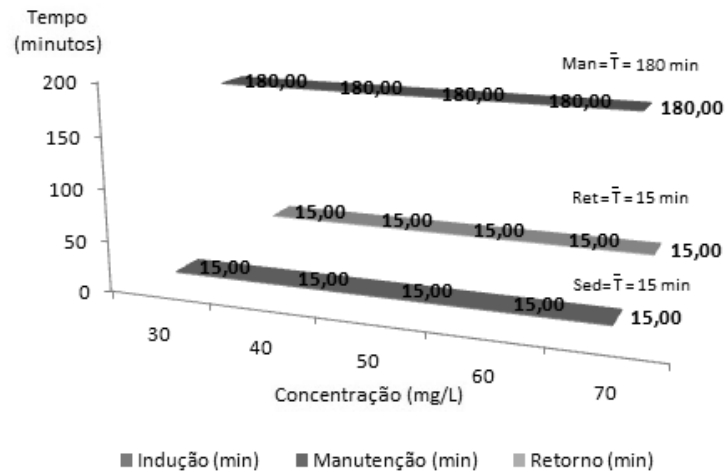


FIGURA 37 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias.

Assim como observado para a sedação, na anestesia os tempos de indução (TI_{ane}) e retorno (TR_{ane}) também foram constantes, independente da dosagem anestésica utilizada.

Os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração (R^2 de 0,9870), indicando que nas dosagens iniciais aumentos na concentração de benzocaína levam a aumentos expressivos no tempo de manutenção (9min/mg/L de benzocaína) e nas dosagens finais tendência à estabilização (a partir de 60 mg/L) (FIGURA 38).

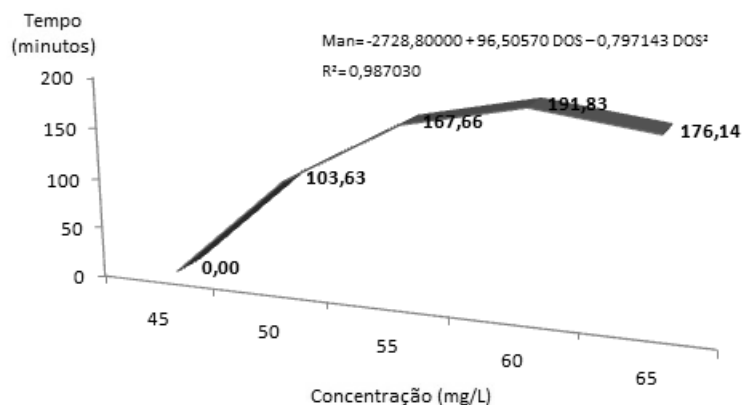


FIGURA 38 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias.

5.1.3.4. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 30 mg/L (T₁), 40 mg/L (T₂), 50 mg/L (T₃), 60 mg/L (T₄) e 70 mg/L (T₅) de benzocaína.

Em todos os tratamentos avaliados, tanto a sedação quanto a anestesia foram observadas a partir de T₁, após 15min e 16 ± 6min de imersão, respectivamente, estado mantido por 180 minutos, em ambos os casos.

Os tempos de retorno à sedação e à anestesia variaram de acordo com a dosagem de anestésico utilizada, apresentando valores constantes nas dosagens iniciais (T₁ a T₃) e crescentes nas dosagens finais (T₄ e T₅).

Na dosagem de 70mg/L (T₅), 80% dos animais anestesiados restabeleceram o comportamento normal e 20% vieram a óbito.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 28.

TABELA 28 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
30	15	180	16	21	180	16
40	15	180	14	16	180	13
50	15	180	16	14	180	14
60	15	180	22	14	180	18
70	15	180	33	15	180	26

Nesta faixa etária, os tempos de indução (TI_{sed}) e de manutenção (TM_{sed}) à sedação foram constantes e iguais a 15min e 180min, respectivamente. Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9873. TR_{sed} apresentou comportamento tendendo à estabilidade, nas concentrações menores e, em seguida crescente, com aumentos no tempo de recuperação nas dosagens maiores (FIGURA 39).

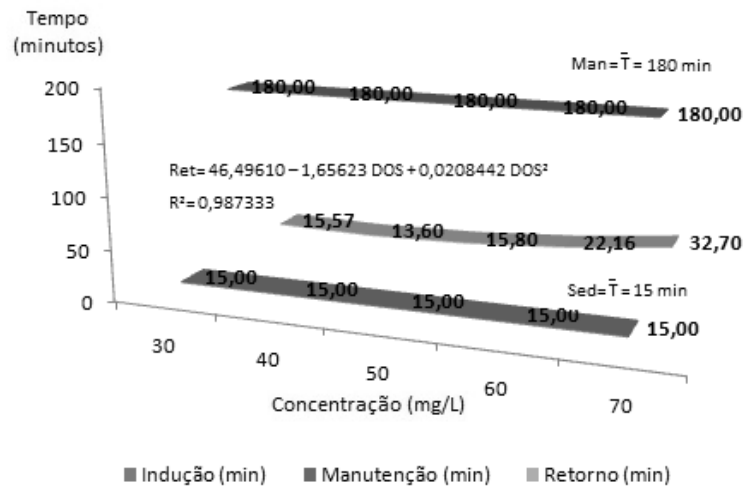


FIGURA 39 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução, manutenção e retorno à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias.

Os tempos de indução à anestesia (TI_{ane}) ajustaram-se a um modelo raiz quadrada em resposta à variação da concentração, com de 0,9001. TI_{ane} apresentou comportamento decrescente, nas concentrações menores, com tendência a estabilidade, nas dosagens maiores (FIGURA 40).

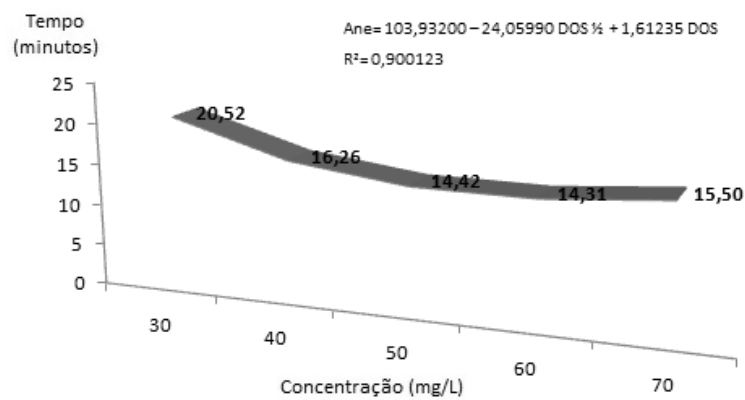


FIGURA 40 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias.

Diversos autores constataram a menor influência no tempo recuperação à anestesia de peixes à medida que se elevou a concentração anestésica (VIDAL *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2007a; VIDAL *et al.*, 2007b).

Assim como ocorreu para a sedação, os tempos de manutenção à anestesia (TM_{ane}) foram constantes, independente da dosagem anestésica utilizada ($T_{médio}=180min$).

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração ($R^2= 0,8571$), indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a aumentos no tempo de retorno (0,24 min/mg/L de benzocaína) (FIGURA 41).

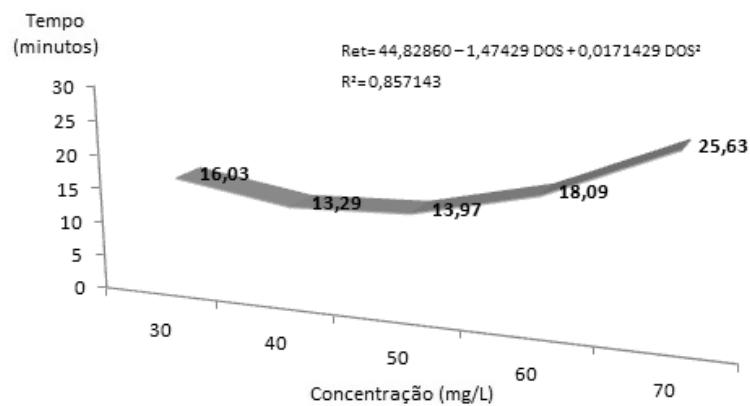


FIGURA 41 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias.

5.1.3.5. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 20 mg/L (T_1), 25 mg/L (T_2), 30 mg/L (T_3), 35 mg/L (T_4) e 40 mg/L (T_5) de benzocaína.

A imersão dos girinos em solução contendo 20mg/L de benzocaína (T_1) levou 80% deles à perda do reflexo de fuga (sedação) após 27 ± 37 min de exposição. Sendo que, dessa parcela 60% foram sedados após 15min, 10% após 60min e 10% após 120min. A manutenção do estado sedado foi observada por um período mínimo de 135 minutos, em 20% dos casos, e máximo de 180 minutos, em 60% da população ($T_{\text{médio}} = 135 \pm 73$ min).

No tratamento T_2 , a sedação foi alcançada novamente por 80% da população amostral. Porém, ao se comparar os tratamentos T_1 e T_2 temos que neste último, a sedação ocorreu após um período médio de imersão menor (12 ± 6 min) e foi mantida por um intervalo de tempo 6% maior do que o observado no tratamento anterior, em média 143 ± 75 min.

Nas demais dosagens, 100% dos girinos não apresentaram resposta a ReF (reflexo de fuga) após em média 16 ± 3 min, estado mantido por um período de 176 ± 13 minutos.

Nas dosagens iniciais (T_1 a T_3), a anestesia foi observada em apenas dois animais (20% da população amostral, em cada um dos tratamentos), não atingindo uma parcela representativa da população. Provavelmente, a baixa eficiência observada na indução à anestesia tenha ocorrido em função da baixa concentração de benzocaína utilizada. Outro resultado que reforça essa hipótese, de baixa eficiência em função da baixa dosagem anestésica, foi o curto período de

manutenção à anestesia observada nos animais anestesiados em cada um dos tratamentos, em média 40min em T₁, 37min em T₂ e 63min em T₃.

Nos tratamentos seguintes (35 mg/L e 40 mg/L), a anestesia foi alcançada por 100% da população amostral após 15min de imersão, estado mantido por 180 minutos em ambos os casos. Todavia, nestes tratamentos observou-se o óbito de 10% (um animal) e 30% (três animais) da população amostral, respectivamente.

Os tempos de retorno à sedação apresentaram valores maiores nas concentrações iniciais com tendência à estabilidade nas últimas, em torno de 15 minutos, enquanto que, os tempos de retorno à anestesia, obtidos a partir de T₄, apresentaram valores crescentes com o aumento da dosagem anestésica, sendo estes iguais a 18 ± 10min e 24 ± 17min, respectivamente.

Os tempos de indução, manutenção e retorno à sedação e à anestesia, em função da concentração do anestésico, estão apresentados na Tabela 29.

TABELA 29 – Valores ajustados dos tempos de indução (TI), manutenção (TM) e retorno (TR) à sedação e à anestesia de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias, expostos à concentrações crescentes de benzocaína

Concentração (mg/L)	Sedação			Anestesia		
	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)	Indução (min)	Manutenção (min)	Retorno (min)
20	25	132	12	-	-	-
25	17	150	11	-	-	-
30	13	165	14	-	-	-
35	13	176	21	15	180	12
40	16	180	30	15	180	21

Nesta faixa etária, os tempos de indução (TI_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático decrescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a redução do tempo de indução (0,42 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína).

Os tempos de manutenção à sedação (TM_{sed}) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9398. Ganhos expressivos em TM_{sed} foram observados logo nas concentrações iniciais, apresentando uma taxa de aumento de 2,88 minutos para cada acréscimo na concentração de 1mg/L de benzocaína (FIGURA 42). Todavia, a partir da dosagem de 35 mg/L (ponto de curvatura máxima), o tempo de manutenção passa a estabilizar, reduzindo a influência da dosagem anestésica no tempo de manutenção à sedação. Assim, a partir desse ponto aumentos na concentração de benzocaína não levam a alterações significativas na manutenção à sedação.

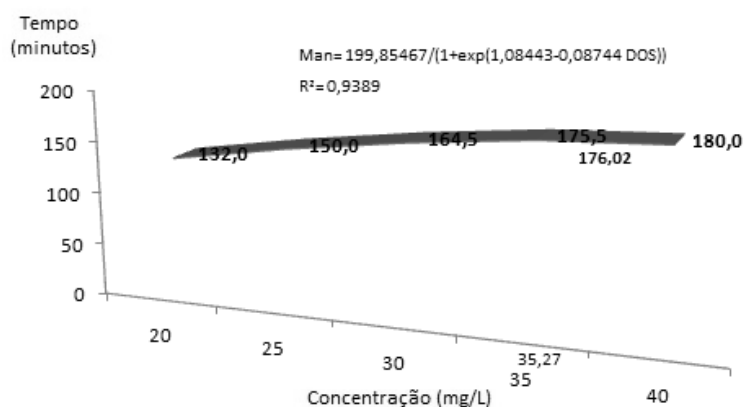


FIGURA 42 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação em função da concentração de benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Os tempos de retorno à sedação (TR_{sed}) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, com ganhos expressivos no tempo de retorno com o aumento da concentração da solução anestésica (0,93 minutos para cada aumento de 1 mg/L de benzocaína).

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos foram reportados por diversos autores, que constataram a redução do tempo necessário para sedação e anestesia de peixes à medida que se elevou a dosagem anestésica ao mesmo tempo em que observaram a maior influência das concentrações na recuperação dos animais (OKAMOTO *et al.* 2009; SILVA *et al.*, 2009; PARK, 2008; COPPOLA *et al.*, 2008; FAÇANHA e GOMES, 2005).

Os tempos de indução (TI_{ane}) e manutenção (TM_{ane}) à anestesia foram constantes, independente da dosagem anestésica utilizada (FIGURA 43).

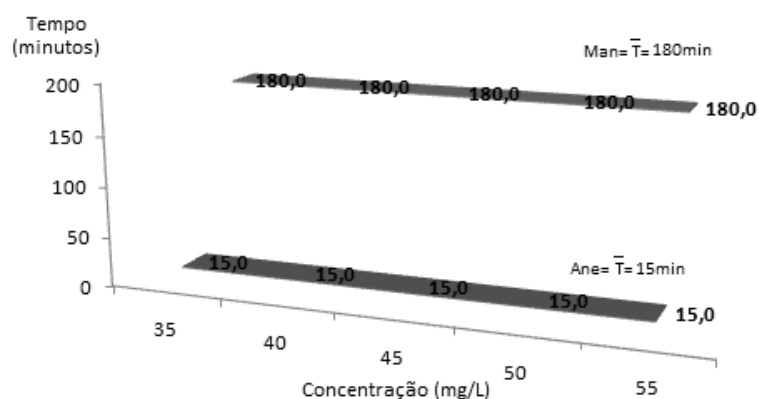


FIGURA 43 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução e manutenção à anestesia em função da benzocaína, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias.

Os tempos de retorno à anestesia (TR_{ane}) ajustaram-se a um quadrático crescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na

concentração anestésica levam a aumentos no tempo de retorno (1,80 minutos para cada acréscimo na concentração de 1mg/L de benzocaína).

Ao observar os gráficos apresentados dos tempos de indução (TI) e retorno (TR), em função da concentração, nota-se que estes apresentaram comportamentos semelhantes nas diferentes faixas etárias.

Embora o uso de anestésicos seja amplamente utilizado no manejo e transporte de diversas espécies de peixes (KING *et al.*, 2005), em anfíbios anuras são poucos os relatos com respeito a esse assunto, e mais raros ainda são os que avaliam o uso de anestésicos em girinos.

Castro *et al.* (2010), de acordo com o tempo de indução e de retorno, o número de animais induzidos à sedação e a taxa de sobrevivência de girinos de rã-touro, nas faixas etárias de 30, 45 e 60 dias, concluíram que a benzocaína é um anestésico eficaz para a sedação, podendo ser utilizado não só no transporte destes animais como também em atividades de manejo.

Em peixes, resultados semelhantes aos encontrados neste estudo tanto para TI quanto para TR foram reportados na literatura. Velasco-Santamaria *et al.* (2008) ao avaliarem a eficiência anestésica da benzocaína em alevinos e juvenis de *Piaractus brachypomus* verificaram que, em juvenis, o tempo de indução foi significativamente maior com o aumento da concentração, enquanto que, em alevinos, ocorreu o inverso, incrementos na concentração levaram a redução de TI. Em ambos os grupos, aumentos na concentração levaram a aumentos em TR.

Resultados análogos foram relatados em juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*) e em alevinos de quinguio (*Carassius auratus*), em que os tempos de indução e de recuperação apresentaram padrão inverso, ou seja, com o aumento da

concentração de benzocaína observou-se a redução de TI e o aumento de TR (OKAMOTO *et al.*, 2009; BITTENCURT *et al.*, 2009). Gimbo *et al.* (2008) e Inoue (2005) utilizando diferentes concentrações de benzocaína para indução anestésica em juvenis de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) relataram resultado semelhante ao descrito anteriormente em TI, todavia, segundo os autores o tempo necessário para a recuperação dos peixes não foi influenciado pela concentração de benzocaína, resultado que corrobora com o comportamento de TR, na faixa etária de 45 dias, encontrado neste trabalho.

Inoue (2005) avaliando a resposta anestésica de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) observaram que inicialmente, o tempo de anestesia foi visivelmente decrescente, a medida que se aumentava a concentração anestésica, e que, a partir de 60 mg/L, os tempo de indução à anestesia não mais se alterava. Resultados que ratificam os obtidos neste trabalho, nas faixas etárias de 15, 30 e 45 dias.

As concentrações mais indicadas para sedação e anestesia de girinos de rã-touro, nas diferentes faixas etárias, encontram-se na Tabela 30.

TABELA 30 – Tempos de indução, manutenção e retorno, em minutos, das concentrações mais indicadas, em mg/L, para sedação e anestesia, de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), de acordo com a faixa etária, em dias

Parâmetros	Faixa etária (dias)				
	15	30	45	60	75
	Sedação				
Concentração (mg/L)	15 a 20	30	45	30 a 50	20 a 30
Indução (min)	15	15	15	15	25 a 13
Manutenção (min)	150 a 180	180	180	180	132 a 165

Retorno (min)	6 a 14	23	15	14 a 16	12 a 14
Anestesia					
Concentração (mg/L)	20	-	50 a 55	40 a 50	35
Indução (min)	15	-	15	16	15
Manutenção (min)	172	-	104 a 180	180	180
Retorno (min)	10	-	15	13 a 14	12

Nas concentrações recomendadas para a sedação, 80% da amostra induzida apresentou ausência de reflexo de fuga e perda total de equilíbrio, com o restabelecimento do comportamento normal sem qualquer alteração visível. Nas concentrações recomendadas para a anestesia, mais de 90% da amostra apresentava ausência de reflexo de fuga, perda total de equilíbrio e ausência de resposta a estímulo nocivo, além de 100% de retorno ao estado normal.

Por meio da metodologia adotada, não foi possível de ser determinar a concentração “ideal” para a anestesia de girinos de rã-touro, na faixa etária de 30 dias, uma vez que, nenhum dos tratamentos avaliados atendeu as condições mínimas estabelecidas. Os tratamentos T₁, T₂, T₃ e T₄ não foram eficazes, anestesiando apenas 10% a 20% da população amostral, e o tratamento T₅ (50 mg/L), embora tenha anestesiado 100% da amostra, levou a óbito 70% da população. Talvez, se o tempo de exposição ao fármaco tivesse sido menor, a concentração “ideal” para a anestesia poderia ter sido estabelecida.

Na literatura são encontradas diferentes recomendações para diferentes espécies de peixes. Velasco-Santamaria *et al.* (2008) inferiram que a concentração mais indicada para a anestesia cirúrgica em alevinos e juvenis de *Piaractus*

brachypomus corresponde a 150 mg/L de benzocaína, apresentando tempos de indução e recuperação de $0,31 \pm 0,01$ e $8,21 \pm 1,48$ minutos (alevinos) e de $0,70 \pm 0,02$ e $6,42 \pm 0,45$ minutos (juvenis), respectivamente.

Bittencurt *et al.* (2009) relataram tempos de indução e retorno à anestesia profunda bastante diferentes, recomendando como a mais indicada a dosagem de 87,5 mg/L de benzocaína (TI= $3,98 \pm 0,72$ minutos; TR= $4,18 \pm 1,00$ minutos) para de alevinos de quinguio (*Carassius auratus*). Heo e Shin (2010) e Gimbo *et al.* (2008) concluíram que a melhor concentração de benzocaína para indução anestésica de juvenis de carpa (*Carassius carassius*) e de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), respectivamente, é de 100mg/L, baseados no tempo necessário para se atingir a anestesia profunda, no tempo de recuperação e na taxa de sobrevivência.

Okamoto *et al.* (2009), em juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*) estabeleceram como ideal para indução anestésica a concentração de 50 mg/L. Valor bastante próximo ao recomendado neste trabalho para girinos situados na faixa etária de 45 dias.

5.1.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol

O desempenho, por faixa etária, dos três compostos avaliados, está demonstrado na Figura 44.

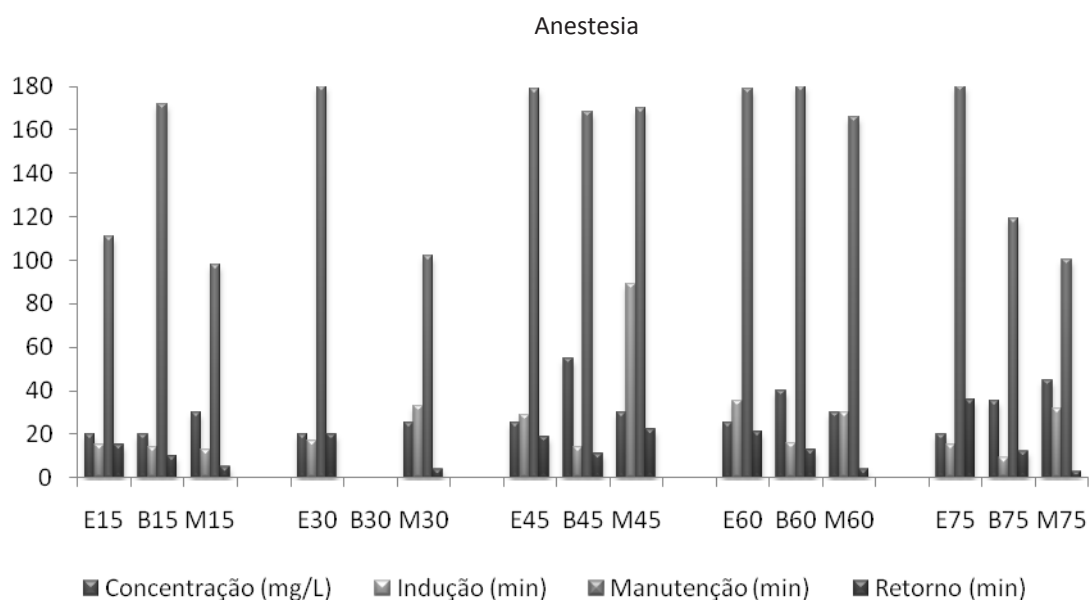
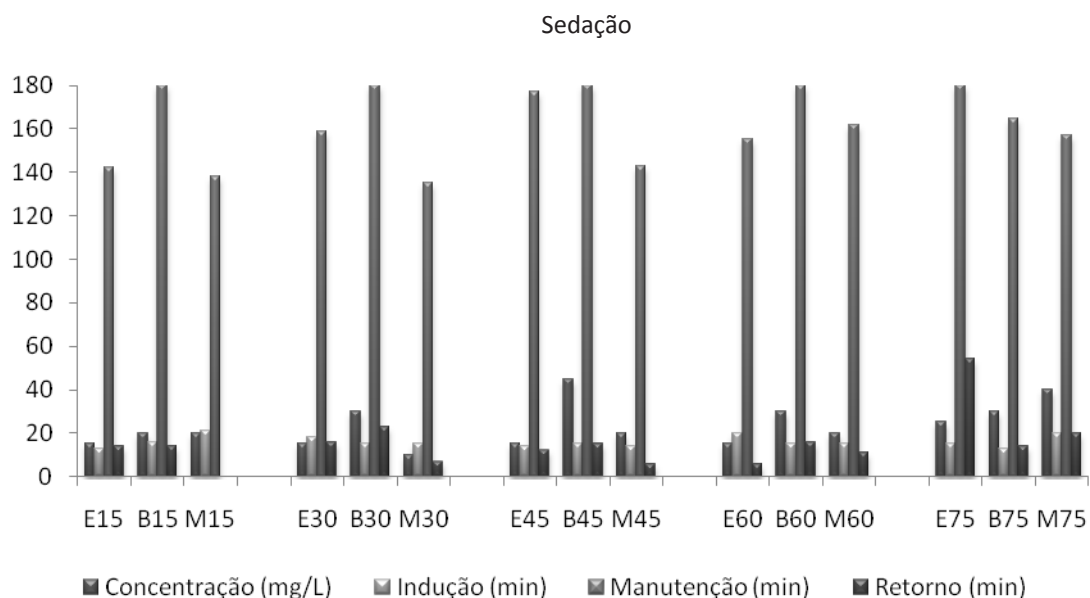


FIGURA 44 – Gráfico das concentrações recomendadas (mg/L), para sedação e anestesia, e os respectivos valores ajustados de indução, manutenção e retorno, em minutos, em função da faixa etária (15, 30, 45, 60 e 75 dias) e anestésico (eugenol=E; benzocaína=B; mentol=M).

Para possibilitar uma comparação entre os anestésicos foi estabelecido um sistema de classificação por pontos, de modo que, cada anestésico foi classificado em “A”, “B” e “C”, de acordo com o desempenho de cada parâmetro avaliado.

Na escolha de anestésico as principais características determinantes para seleção são a eficácia em baixas concentrações ou dosagens, menor tempo de indução e recuperação e facilidade de manutenção (ROSS e ROSS, 2008; OKAMOTO *et al.*, 2009; MARKING e MEYER, 1985). O tempo de manutenção desejável de um anestésico depende da finalidade da indução anestésica, se for para transporte a longas distâncias, o ideal é que o composto forneça maior tempo de sedação. Já, para o manejo diário ou transporte a curtas distâncias a manutenção à sedação por longos períodos não é necessária, sendo indesejável.

Neste trabalho verificamos também a possibilidade de manter os girinos anestesiados por um longo tempo, logo a manutenção longa foi uma característica desejável.

Assim, de acordo com esses conceitos, cada um dos parâmetros foi classificado em “A”, “B” ou “C”, o que forneceu ao anestésico avaliado, um saldo de 3, 2 ou 1 ponto, respectivamente, para cada característica avaliada (concentração, tempo de indução, tempo de manutenção e tempo de retorno), como exemplificado na Tabela 31. A partir do somatório do saldo parcial de cada um dos anestésicos, nas cinco faixas etárias, determinou-se o agente anestésico de melhor desempenho geral.

TABELA 31 – Esquema de pontuação dos compostos anestésicos (eugenol, benzocaína e mentol), por faixa etária, em função das características: concentração, tempo de indução, tempo de manutenção

	Concentração	Indução	Manutenção	Retorno	Saldo parcial
Faixa etária: 15 dias					
Eugenol	3	3	2	2	10
Benzocaína	2	2	3	2	9
Mentol	2	1	2	3	8
Faixa etária: 30 dias					
Eugenol	2	2	2	2	8
Benzocaína	1	3	3	1	8
Mentol	3	3	1	3	10
...					

Ao avaliar as concentrações recomendadas (sedação e anestesia) e os tempos de indução, manutenção e retorno, individualmente, observou-se que dependendo da faixa etária e dos parâmetros analisados um ou outro anestésico se sobressaia. Para a sedação, o eugenol apresentou melhor desempenho nas faixas etárias de 15 e 45 dias. A benzocaína e o mentol apresentaram melhores resultados na faixa etária de 75 e 30 dias, respectivamente. Já, na faixa etária de 60 dias, o mentol e o eugenol foram equivalentes e a benzocaína apresentou o pior resultado. Para a anestesia, a benzocaína se sobressaiu aos demais, na faixa etária de 15 dias, mas apresentou resultados similares ao mentol e ao eugenol na faixa etária de

60 e 75 dias, respectivamente. O eugenol apresentou melhores resultados nas faixas etárias de 30 e 45 dias. O mentol embora tenha demonstrado ser um bom indutor tanto a sedação quanto a anestesia não obteve bons resultados quanto à manutenção do estado anestésico, provavelmente, devido a sua alta volatilidade.

Em peixes, alguns estudos confirmam a possibilidade de fatores biológicos como idade, o tamanho e o sexo possam influenciar na resposta a uma determinada dosagem e demonstram a existência de correlação entre tamanho do indivíduo e tempos de indução e retorno, resultados que corroboram com o encontrado neste trabalho, todavia, outros indicam o contrário (STEHLY e GINGERICH, 1999; TSANTILAS *et al.*, 2006; CUNHA, 2007; ROSS e ROSS, 2008; ZAHL *et al.*, 2009).

No geral, tanto para sedação quanto para anestesia de girinos de rã-touro, o composto anestésico que apresentou o melhor desempenho, considerando concentração utilizada e os tempos de indução, manutenção e retorno, foi o eugenol, enquanto que o mentol e a benzocaína apresentaram resultados equivalentes.

Anzileiro *et al.* (2008) ao avaliarem a eficiência de quatro anestésicos no manejo de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*), entre eles, o óleo de cravo, a benzocaína, a quinaldina e o mentol, concluíram que o eugenol e a quinaldina são os anestésicos mais eficazes e seguros. Resultado semelhante foi reportado por Inoue (2005), ao comparar a resposta de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) à ação da benzocaína, do eugenol e do fenoxietanol. Segundo o autor o eugenol foi o mais eficiente, pois necessitou de menores concentrações para que os peixes atingissem o mesmo estado de anestesia em menores intervalos de tempo.

Okamoto *et al.* (2009) concluíram que tanto o eugenol quanto a benzocaína são bons anestésicos para juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*) mas, em termos econômicos, a benzocaína apresenta melhor custo benefício.

5.2. FASE 1 – GIRINOS II

Assim como na fase anterior, durante a fase de indução anestésica, por meio de benzocaína, eugenol e mentol, os girinos de rã-touro, em todas as faixas etárias avaliadas, apresentaram o mesmo comportamento inicial caracterizado por agitação inicial (hiperatividade), seguido de natação lenta; parada dos animais, em que a natação só foi observada após estímulo externo (movimentação dos sacos), ausência total dos movimentos; parada dos animais em decúbito dorsal e, em alguns casos, na posição lateral. Nas concentrações maiores, a passagem gradativa por essas fases comportamentais não foi evidente devido à velocidade de ação dos anestésicos.

5.2.1. Benzocaína

5.2.1.1. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de benzocaína.

Após a imersão dos girinos de *Lithobates catesbeianus*, em 10 mg/L de benzocaína (T₁) durante 60 minutos, menos de 50% deles foram induzidos à sedação (NI=2), resultado mantido nas observações seguintes, após 120min, 180min e 240min de exposição ao anestésico. Após 300 minutos de imersão, 100% dos animais apresentavam comportamento normal (NI=1), ou seja, apresentavam resposta a estímulos externos (movimentação errática no interior dos sacos).

No tratamento T₂ (15 mg/L) mais de 50% dos animais foram induzidos à sedação (NI=3), após 60 minutos de imersão e, assim como na concentração anterior, o resultado se manteve nas observações posteriores (120min, 180min e 240min). Após 300 minutos, ao contrário do relatado anteriormente, os animais continuavam a não apresentar resposta a estímulos externos, estado que se alterou somente após 24 horas, quando foi observado o retorno ao comportamento normal em 100% dos girinos sedados (NI=1). Nas concentrações seguintes, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de benzocaína, 100% dos girinos de rã-touro foram induzidos a sedação logo após a imersão em solução anestésica, situação que se manteve por 24 horas.

A imersão dos girinos de rã-touro, nas cinco concentrações avaliadas, levou a sedação dos mesmos, por um período de quatro (T₁) a cinco horas (T₂ a T₅), com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais. A sedação por um período de 24 horas foi observada apenas nas concentrações de 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L, porém, nesta última (T₅) observou-se o não retorno (óbito) de 50% dos girinos sedados.

De acordo com as equações de regressão ajustadas, o ponto de curvatura máximo (PCM) da benzocaína, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração igual a 20,51 mg/L (FIGURA 45).

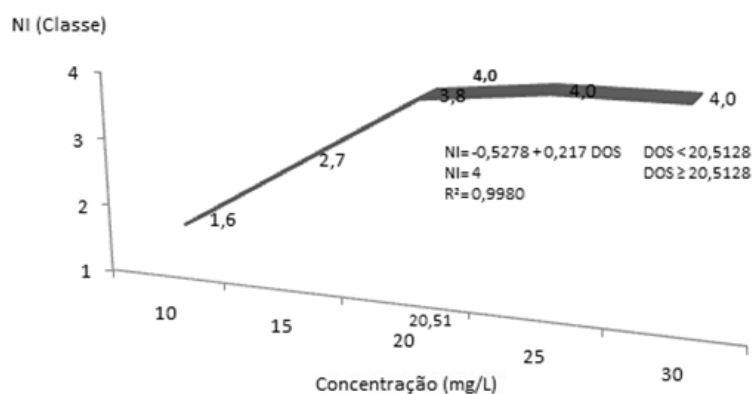


FIGURA 45 – Valores ajustados pela regressão do número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa etária de 30 dias, induzidos à sedação, em função da concentração da solução de benzocaína. NI: 1= 0%; 2= -50%; 3= +50%, 4= 100%.

A imersão de girinos de *L. catesbeianus* em concentrações inferiores ao PCM, o NI (número de animais induzidos) apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou.

Embora o aumento na concentração de benzocaína acima do ponto de curvatura máximo não altere o NI, a elevação na concentração de benzocaína, acima desse ponto (PCM), levou ao aumento no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro de 2,54 minutos, em T_4 , e de 6,95 minutos, em T_5 (FIGURA 46).

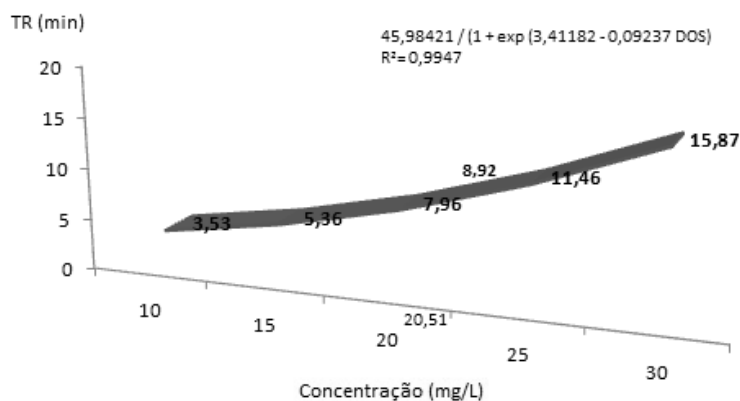


FIGURA 46 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), com 30 dias de idade, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.

Nas cinco concentrações de benzocaína avaliadas, o NR variou entre 1,00 (valor mínimo) e 1,15 (valor máximo), indicando que embora 100% dos girinos de rã-touro tenham retornado ao estado normal após indução anestésica, aumentos na concentração levam a redução gradual de NR.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, ajustou-se a um modelo quadrático em resposta a variação da concentração, com R^2 igual a 0,8571 indicando que variações na concentração explicam mais de 85% da variação em NR. O NR apresentou tendência quase que constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) nos três primeiros tratamentos (FIGURA 47). A partir de T4 (25 mg/L) houve tendência de aumento em NR, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. O ponto máximo, no qual se observou 100% de óbito (NI=4), ocorreu na dosagem de 70 mg/L.

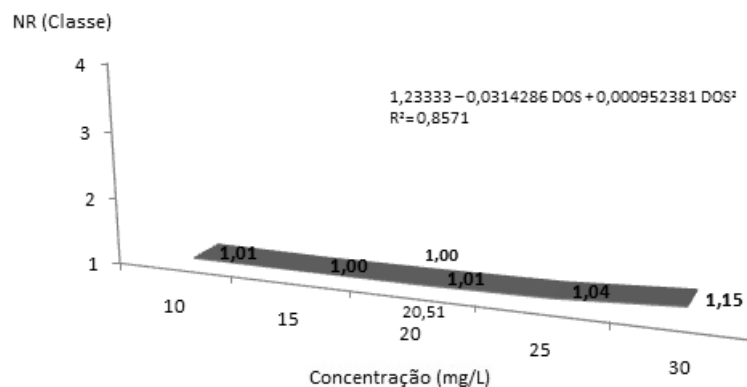


FIGURA 47 – Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) com 30 dias de idade, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol. NR: 1= 100%; 2= + 50%; 3= -50%; 4= 0%.

5.2.1.2. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de benzocaína.

A imersão dos girinos em 10 mg/L de benzocaína (T₁), durante 60min e 120min, não induziu os animais a sedação, de modo que, todos continuaram a apresentar comportamento normal (NI=1), ou seja, apresentavam resposta a estímulos externos. Somente a partir de 180 minutos de imersão é que parte dos girinos foi sedada, menos de 50% (NI=2), resultado que se manteve nas observações posteriores mesmo após 300 minutos de imersão.

Na segunda concentração avaliada, a imersão de girinos de rã-touro, em 15 mg/L de benzocaína (T₂) por 60 minutos induziu à sedação, menos de 50% dos animais (NI=2) e, assim como na concentração anterior, o resultado se manteve nas observações posteriores (120min, 180min, 240min, 300min e 1440min). Nos tratamentos seguintes, 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de benzocaína,

100% dos girinos de rã-touro foram induzidos à sedação logo após a imersão em solução anestésica, situação que se manteve por 24 horas.

Com exceção do primeiro e do último tratamento (imersão dos girinos em 10 mg/L e 30 mg/L de benzocaína), a imersão dos girinos de rã-touro, nas demais soluções anestésicas avaliadas, levou à sedação dos mesmos, por um período de até 24 horas, com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais. Embora o tratamento cinco (30 mg/L de benzocaína) tenha induzido 100% dos girinos à sedação, em menos de 5 minutos, a imersão por um período de 24 horas levou à óbito 50% dos animais.

De acordo com as equações de regressão ajustadas, em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária, o ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação (NI), por meio da benzocaína, foi máximo, ocorreu na concentração igual a 21,00 mg/L

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 45 dias, em concentrações inferiores a PCM, o NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou. Embora o aumento na concentração de benzocaína, acima do ponto de curvatura máximo, não altere o NI, aumentos na concentração de benzocaína, acima de PCM causam um pequeno aumento no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro, de 3,06 e 5,32 minutos, respectivamente (FIGURA 48).

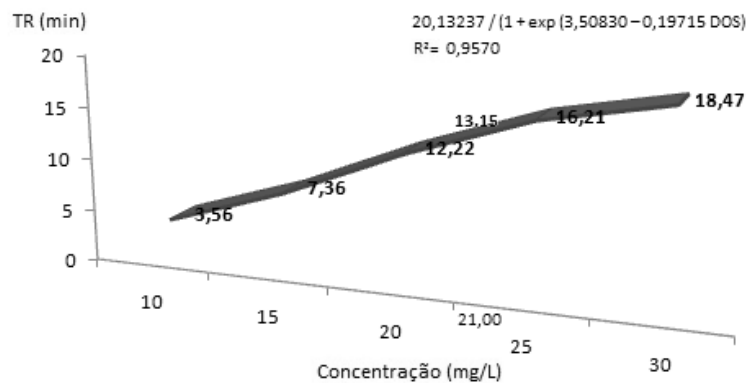


FIGURA 48 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 0,99 (valor mínimo) e 1,15 (valor máximo), indicando que embora 100% dos animais tenham retornado ao estado normal após indução anestésica, o aumento na concentração leva a redução gradual de NR (FIGURA 49).

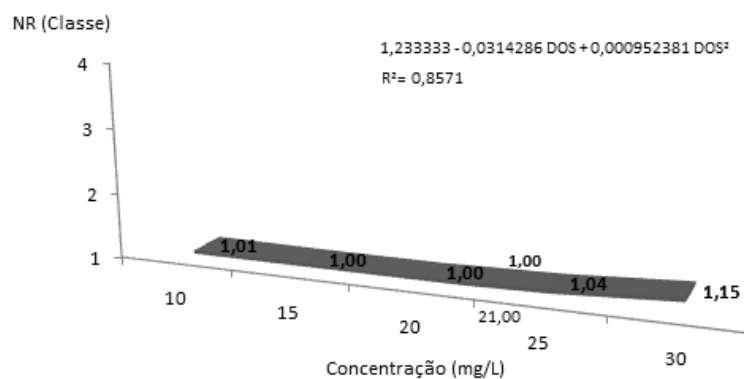


FIGURA 49 – Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) com 45 dias de idade, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína. NR: 1= 100%; 2= + 50%; 3= -50%; 4= 0%.

5.2.1.3. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 15 mg/L (T₁), 20 mg/L (T₂), 25 mg/L (T₃), 30 mg/L (T₄) e 35 mg/L (T₅) de benzocaína.

A imersão de girinos de *Lithobates catesbeianus* em 15 mg/L de benzocaína (T₁) induziu menos de 50% dos girinos a sedação (NI=2), após 60 minutos. Uma hora depois, mais de 50% dos animais encontravam-se sedados (NI=3) e na observação seguinte, após 180 minutos de imersão, 100% dos girinos não apresentavam resposta a estímulos externos, resultado que se manteve por uma hora. Após 300 minutos de imersão 100% dos animais já apresentavam resposta a estímulos externos.

Na segunda concentração avaliada, a imersão de girinos de rã-touro, em 20 mg/L de benzocaína (T₂) por 60 minutos induziu à sedação, mais de 50% dos animais (NI=3), resultado que se manteve na observação posterior (120 minutos), todavia, após uma hora menos de 50% dos girinos permaneciam sedados (NI=2) e após 24 horas 100% dos girinos apresentavam comportamento normal.

O tratamento T₃ (25 mg/L) induziu a sedação 100% dos girinos logo após a imersão dos animais, porém, após 180 minutos, parte dos animais já apresentava resposta a estímulos externos (NI=3), resultado que se manteve por 24 horas.

Nos tratamentos seguintes, 30 mg/L (T₄) e 35 mg/L de benzocaína (T₅), 100% dos girinos de rã-touro foram induzidos à sedação logo após a imersão em solução anestésica, situação observada por 24 horas.

Com exceção dos dois primeiros tratamentos (imersão dos girinos em 15 mg/L e 20 mg/L de benzocaína), a imersão dos girinos de rã-touro, nas demais

soluções anestésicas avaliadas, levou a sedação dos mesmos, por um período de até 5 horas, com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais sedados.

A sedação por 24 horas foi observada somente nos três últimos tratamentos (25 mg/L, 30 mg/L e 35 mg/L de benzocaína), porém, o restabelecimento do comportamento normal, de 100% dos girinos sedados, foi observado apenas no tratamento T₃. Nos tratamentos T₄ e T₅, o NR foi igual a três (NR=3) e quatro (NR=4), respectivamente, ou seja, menos de 50% dos girinos sedados restabeleceram o comportamento normal, após indução anestésica por 24 horas, em 30 mg/L de benzocaína e 0% dos girinos sedados restabeleceram o comportamento normal, após indução anestésica por 24 horas, em 35 mg/L de benzocaína.

O número de girinos induzidos a sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear. De acordo com as equações de regressão ajustadas em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária, o ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação, por meio da benzocaína, foi máximo, ocorreu na concentração igual a 35,00 mg/L.

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 60 dias, em concentrações inferiores a PCM (35 mg/L), o NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou. Embora o aumento na concentração de benzocaína, acima do ponto de curvatura máximo, não altere o NI, aumentos na concentração de benzocaína, acima de PCM levam ao aumento no tempo de retorno (TR) dos girinos de 5,95 minutos (FIGURA 50).

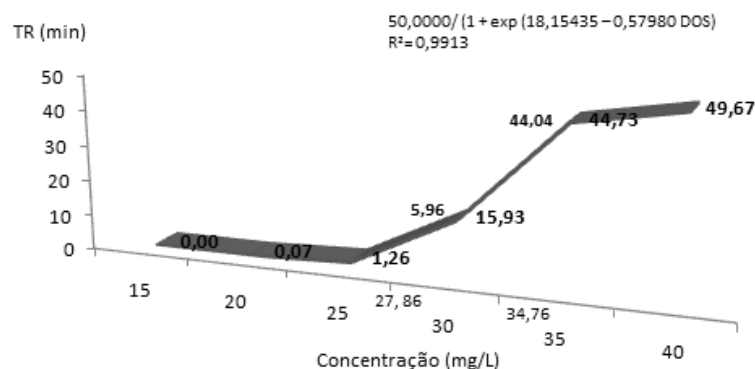


FIGURA 50 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 0,96 (valor mínimo) e 1,68 (valor máximo), indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a redução gradual de NR.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, ajustou-se a um modelo quadrático em resposta a variação da concentração, com tendência quase que constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) nos três primeiros tratamentos e a partir de T₄ (30 mg/L) aumento em NR, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal (FIGURA 51). O ponto máximo, no qual se observou 100% de óbito (NI=4), ocorreu na dosagem de 50 mg/L.

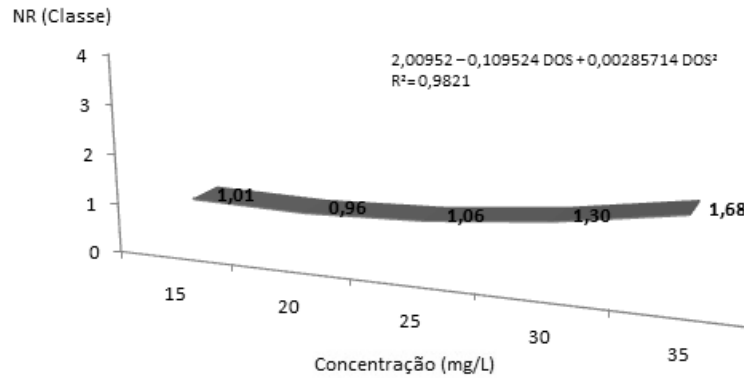


FIGURA 51 - Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína. NR: 1= 100%; 2= + 50%; 3= -50%; 4= 0%.

5.2.1.4. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de benzocaína.

A imersão de girinos de *Lithobates catesbeianus* em 10 mg/L e 15 mg/L de benzocaína induziu 100% dos girinos a sedação (NI=4), após 60 minutos, estado mantido nas observações posteriores (120min, 180min e 240min). Após 300 minutos de imersão menos de 50% dos girinos estavam sedados, resultado observado, também, após 24 horas.

A partir do tratamento T₃ (20 mg/L) 100% dos girinos foram induzidos a sedação logo após a imersão (NI=4), resultado que se manteve por 24 horas.

Com exceção dos tratamentos T₁ e T₂ (imersão dos girinos em 10 mg/L e 15 mg/L de benzocaína, respectivamente), a imersão dos girinos de rã-touro, nas demais soluções anestésicas avaliadas, levou a sedação 100% dos animais, por um

período de 24 horas. O não restabelecimento do comportamento normal, em 100% dos animais sedados, foi observado apenas após 24 horas de indução.

O número de girinos induzidos a sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear. De acordo com a equação de regressão ajustada, em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária, o ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação, por meio da benzocaína, foi máximo, ocorreu na concentração igual a 21,67 mg/L.

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 75 dias, em concentrações inferiores a PCM (21,67 mg/L), o NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou.

O tempo de retorno da benzocaína ajustou-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta a variação da concentração, com R^2 de 0,9913. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 7,15 mg/L, indicando o início de aumentos expressivos em TR e o ponto de curvatura máximo ocorreu na concentração de 33,14 mg/L, indicando que a partir dessa dosagem o TR começou a estabilizar.

Embora aumentos na concentração de benzocaína, acima do ponto de curvatura máximo, não alterem NI, aumentos na concentração de benzocaína, acima de PCM (21,67 mg/L) levam a aumentos no tempo de retorno (TR) dos girinos de 3,23 minutos (T_3), 7,04 minutos (T_4) e 9,39 minutos (T_5) (FIGURA 52).

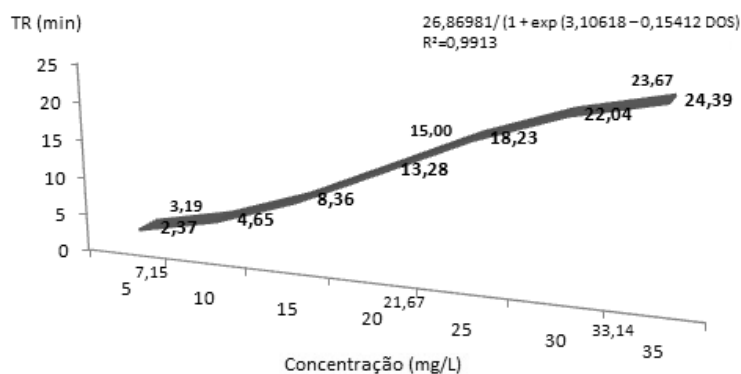


FIGURA 52 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal ajustou-se a um modelo quadrático crescente em resposta a variação da concentração, indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a redução gradual do número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. Todavia, nas concentrações avaliadas, NR variou entre 1,0 (valor mínimo) e 1,20 (valor máximo) apresentando tendência praticamente constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados), de modo que aumentos na concentração anestésica não levaram a alterações significativas em NR.

Em todas as faixas etárias avaliadas tanto o aumento da concentração quanto o tempo de exposição à benzocaína influenciaram no tempo de retorno dos girinos, aumentando-a. Trabalhos anteriores, com diferentes espécies de peixes, têm demonstrado que o tempo de recuperação é influenciado não só pelo tempo de exposição ao fármaco como também pela temperatura da água (SIMOES e GOMES,

2009; PARK *et al.*, 2008; MYLONAS *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2001; OSTRENSKY *et al.*, 2000).

No presente trabalho embora a temperatura da água não tenha sido controlada, esta não apresentou alterações significativas que pudessem interferir nos resultados.

As concentrações indicadas para sedação de girinos de rã-touro, nas diferentes faixas etárias encontram-se na Tabela 32.

TABELA 32 – Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição à benzocaína

Parâmetros	Faixa etária			
	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
Concentração (mg/L)	20,51	21,00	30,00	18,00
Tempo de retorno (min)	8,92	13,15	15,93	11,22
Nº girinos induzidos (%)	100	100	100	100
Nº girinos retornaram (%)	100	100	100	100

Recomendações semelhantes, para sedação de juvenis de *Menidia estor*, foram publicadas por Ross *et al.* (2007). Segundo os autores, as concentrações ideais para sedação de juvenis de *M. estor* encontram-se entre 15 mg/L a 18 mg/L e relatam ainda que concentrações superiores a 40 mg/L de benzocaína, resultam em hemorragia nas nadadeiras e na cabeça que induzem os peixes à morte.

Oliveira *et al.* (2009) ao simular o transporte de juvenis e alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) reportaram que no tratamento com 40 mg/L de benzocaína,

100% dos animais encontravam-se sedados (sem locomoção e equilíbrio) após 5 minutos de exposição ao anestésico. Os autores observaram também que após 120min e 180min de imersão, apenas 30% e 4% de juvenis e 80% e 2% de alevinos, respectivamente, encontravam-se levemente sedados (perda parcial do equilíbrio) e que, ao final de 240 minutos de exposição à benzocaína, 100% dos animais já haviam restabelecido o comportamento normal. Na dosagem de 20 mg/L, o resultado obtido pelos autores foi bastante inferior ao obtido no presente trabalho. Com 20 mg/L de benzocaína, os autores obtiveram apenas 45% da população de alevinos e juvenis de tilápia sedados.

Em alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a dosagem de 50 mg/L de benzocaína induziu à sedação 80% da população amostral por um período de 60 minutos (BARBOSA *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos têm demonstrado que além de variar entre as espécies, a dose de anestésico necessária para indução está diretamente ligada à idade, ao tamanho do corpo, ao conteúdo de gordura corporal e ao sexo (ROSS e ROSS, 2008; DELBON, 2006; CUNHA e ROSA, 2006). Além disso, em anfíbios é nesta fase (pré-metamórfica), que se iniciam diversas alterações fisiológicas para a transição da fase larval e aquática para a fase pós-metamórfica e terrestre, o que pode deixar os animais mais sensíveis à ação dos anestésicos. O que justifica a menor dosagem anestésica requerida para sedação na faixa etária de 75 dias, onde os animais encontram-se mais próximos ao clímax de metamorfose.

5.2.2. Eugenol

5.2.2.1. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 5 mg/L (T₁), 10 mg/L (T₂), 15 mg/L (T₃), 20 mg/L (T₄) e 25 mg/L (T₅) de eugenol.

Após imersão por 60 minutos em 5 mg/L de óleo de cravo (T₁) mais de 50% dos girinos de *Lithobates catesbeianus* foram induzidos à sedação (NI=3). O mesmo resultado foi constatado nas observações seguintes, após 120min, 180min, 240min e 300min de imersão. Entretanto, após 24 horas, 100% dos animais apresentavam comportamento normal, ou seja, apresentavam resposta a estímulos externos (NI=1).

No tratamento T₂ (10 mg/L de eugenol), mais de 50% dos animais foram induzidos à sedação, após 60 minutos de imersão e, após 120 minutos, 100% dos animais encontravam-se sedados (NI=4), resultado que se manteve nas três observações posteriores (180min, 240min e 300min). Contudo, após 24 horas (1440 minutos) o NI observado foi igual a três (NI=3) indicando o retorno ao estado normal de parte dos girinos sedados (menos de 50%).

Nas concentrações posteriores (15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L de eugenol), os girinos de rã-touro foram sedados logo após a imersão em solução aquosa e permaneceram nesse estado (100% sedados) até o fim do período experimental (24 horas).

A imersão dos girinos de rã-touro, nas soluções anestésicas avaliadas, levou a sedação dos mesmos, por um período de até cinco horas, com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais. Todavia, a imersão dos girinos por um período de 24 horas, nas concentrações de 10 mg/L e 15 mg/L, resultou em não retorno (óbito) de até 50% da população, enquanto que, nos tratamentos

posteriores 20 mg/L (T4) e 25 mg/L (T5), a imersão dos girinos por 24 horas resultou em óbito em mais de 50% e 100% dos girinos sedados, respectivamente.

De acordo com a equação de regressão ajustada em função da concentração de eugenol para as variáveis, anestésico e faixa etária, o ponto de curvatura máximo (PCM) em que o número de animais induzidos à sedação (NI) foi máximo, ou seja, de 100% (NI=4), ocorreu na concentração igual a 11,67 mg/L.

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus* em concentrações inferiores ao PCM, NI apresentou crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou.

Os tempos de retorno à sedação (TR) ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta a variação da concentração, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a aumentos expressivos em TR (3,58 min/ mg/L de eugenol).

Embora, o aumento na concentração de eugenol acima do ponto de curvatura máximo não altere o NI, a elevação na concentração de óleo de cravo, acima desse ponto (PCM), onde TR foi de 40,80 minutos, levou a aumentos expressivos no tempo de recuperação dos girinos de rã-touro, sendo esses valores iguais a 13,82 minutos; 27,51 minutos e 32,75 minutos, respectivamente (FIGURA 53).

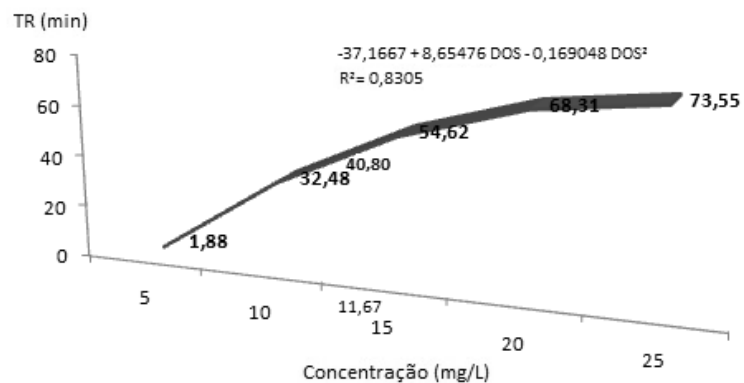


FIGURA 53 – Valores ajustados pela regressão do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal ajustou-se a um modelo quadrático crescente em resposta a variação da concentração, com R^2 de 0,9596. Nas cinco concentrações avaliadas, NR variou entre 1,02 e 1,49, indicando que, embora 100% dos animais tenham retornado ao estado normal, após indução anestésica, aumentos na concentração da solução anestésica levam a redução gradual de NR. Segundo o modelo ajustado, o ponto de máximo, no qual se observa 100% de óbito (NI=4), ocorre na dosagem de 50 mg/L.

5.2.2.2. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 5 mg/L (T_1), 10 mg/L (T_2), 15 mg/L (T_3), 20 mg/L (T_4) e 25 mg/L (T_5) de eugenol.

A imersão de girinos de rã-touro em solução aquosa contendo 5 mg/L de óleo de cravo não surtiu efeito nos primeiros 60 minutos (NI=1) e após 120 minutos,

menos de 50% dos girinos foram induzidos à sedação (NI=2), resultado também observado, após 180min e 240min de imersão. Cinco horas depois do início do experimento, 100% dos girinos apresentavam comportamento normal, ou seja, apresentavam resposta a estímulos externos (NI=1).

Na segunda concentração avaliada (10 mg/L de eugenol), após 60 minutos de imersão em solução anestésica, menos de 50% dos girinos foram sedados (NI=2). Esse resultado foi observado, também, após 120min, 180min, 240min, 300min e 1440min de imersão.

Nas concentrações posteriores (15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L de eugenol), 100% dos girinos de rã-touro foram sedados logo após a imersão em solução aquosa e permaneceram nesse estado (100% sedados) até o fim do período experimental (24 horas).

A imersão dos girinos de rã-touro, em soluções anestésicas com concentração superior a 5 mg/L, levou a sedação dos mesmos, por um período de até cinco horas, com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais. Todavia, a imersão dos girinos por um período de 24 horas, nas concentrações de 20 mg/L e 25 mg/L, resultou em não retorno (óbito) em 100% dos animais avaliados.

Conforme a equação de regressão ajustada de NI, o ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração igual a 16,00 mg/L. Assim, na imersão de girinos de *L. catesbeianus* em concentrações inferiores a esse ponto, o NI apresentou um crescimento linear, com ganhos expressivos, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais

induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou. Embora, o aumento na concentração de eugenol acima do ponto de curvatura máximo não altere o NI, a elevação na concentração de óleo de cravo, acima desse ponto (PCM), levou a aumentos expressivos no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro, valores estes iguais a 11,80 e 30,30 minutos, respectivamente (FIGURA 54).

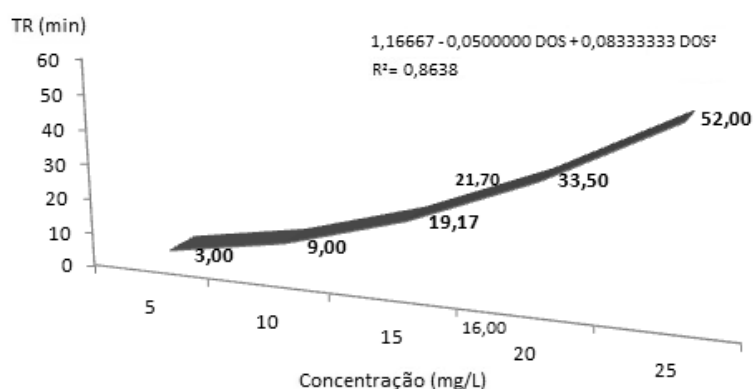


FIGURA 54 – Valores ajustados pela regressão do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de eugenol.

Nos tratamentos T₄ (20 mg/L de eugenol) e T₅ (25 mg/L de eugenol), o número de animais que restabeleceram o comportamento normal (NR) foi de 50% e nos demais tratamentos (5 mg/L, 10 mg/L e 15 mg/L de eugenol) de 100%.

NR ajustou-se a um modelo linear crescente e variou entre 0,97 (valor mínimo) e 1,70 (valor máximo). Acima do PCM, onde NR foi de 1,37, além do aumento expressivo no TR dos girinos sedados, ocorre também uma redução gradual e crescente do número de animais que restabeleceram o comportamento normal, chegando a perdas de até 50% dos animais imersos.

5.2.2.4. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de eugenol.

A imersão de girinos de rã-touro em solução aquosa contendo 10 mg/L de óleo de cravo (T₁) por 60 minutos, resultou na sedação de menos de 50% da população amostral (NI=2). Na observação seguinte, após 120 minutos de imersão, mais de 50% dos girinos encontravam-se sedados (NI=3) e após 180 minutos, 100% dos animais não apresentavam qualquer reação a estímulos externos. No final do período experimental (24 horas de imersão) menos de 50% dos girinos permaneciam sem apresentar qualquer resposta a estímulos externos (NI=2).

Nos demais tratamentos, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de óleo de cravo, 100% dos girinos foram sedados logo após a imersão em solução aquosa, entretanto, o restabelecimento do comportamento normal (TR) não foi observado mesmo após 24 horas de imersão em água livre de anestésico.

A imersão dos girinos de rã-touro, em 10 mg/L de eugenol, levou a sedação dos mesmos por até 24 horas com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais sedados. O uso de soluções anestésicas de óleo de cravo em concentração superiores a 10 mg/L, resultou em não retorno (óbito) em 100% dos animais avaliados.

O número de girinos induzidos a sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear. Conforme a equação de regressão ajustada para NI, o ponto de curvatura máximo (PCM) do eugenol, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração de 15,00 mg/L.

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 60 dias, em concentrações inferiores a PCM (15 mg/L), NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou.

Embora, o aumento na concentração de eugenol acima do ponto de curvatura máximo não altere o NI, a elevação na concentração de óleo de cravo, acima desse ponto (PCM), levou ao aumento no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro, a valores extremos (180 minutos), indicando o não retorno dos mesmos. Os tempos de retorno ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta a variação da concentração, onde o ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 10,60 mg/L (TR=21,50 minutos) e o ponto de curvatura máximo (estabilização de TR) na concentração de 12,96 mg/L (TR= 158,72 minutos). Acima desse ponto aumentos na concentração de eugenol não levam a alterações significativas no tempo de retorno (TR= 180 minutos).

Nos tratamentos T₁ (10 mg/L de eugenol) e T₂ (15 mg/L de eugenol), o número de animais que restabeleceram o comportamento normal (NR) foram de 100% (NR=1) e menos de 50% (NR=3), respectivamente. Nos demais tratamentos (20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de eugenol), NR foi igual a quatro, indicando o não retorno dos animais sedados.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 1,21 (valor mínimo) e 4,00 (valor máximo), indicando que acima do PCM, além do aumento expressivo no TR dos girinos sedados, ocorre também uma redução expressiva de NR, chegando a perdas de 100% dos animais imersos.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal ajustou-se a um modelo raiz quadrada crescente em resposta a variação da concentração, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, até a dosagem de 20 mg/L, e em seguida tendência à estabilidade, onde o número de animais que retornaram ao estado normal atingiu o ponto máximo (NR=4), com 100% de óbito.

5.2.2.4. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de eugenol.

Após 60 minutos de imersão em solução aquosa contendo de 10 mg/L e 15 mg/L de óleo de cravo, 100% dos de girinos de rã-touro encontravam-se sedados (NI=4), estado mantido por um período de 4h e 5h, respectivamente. Após 24 horas, menos de 50% dos girinos não apresentavam resposta a estímulos externos (NI=2).

Nos demais tratamentos (20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de óleo de cravo), 100% dos girinos foram sedados logo após a imersão em solução aquosa. Nessas concentrações, a ausência de resposta a qualquer estímulo, ou seja, a sedação foi observada por um período de 24 horas.

Com exceção dos tratamentos T₁ e T₂, a imersão dos girinos de rã-touro, nas demais soluções anestésicas avaliadas, levou a sedação 100% dos animais, por um período de 24 horas.

O número de girinos induzidos a sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária. O ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação, por meio do eugenol, foi máximo, ocorreu na concentração de 20 mg/L.

Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 75 dias, em concentrações inferiores a PCM, NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, NI se estabilizou. Embora aumentos na concentração do eugenol, acima do ponto de curvatura máximo, não alterem o valor de NI, estes levam a aumentos expressivos no tempo de retorno dos animais, de 11,22 minutos (T_4) e 22,33 minutos (T_5). O tempo de retorno ajustou-se a um modelo linear simples crescente em resposta a variação da concentração, com aumentos expressivos no tempo de retorno com o aumento da concentração anestésica (2,23 minutos a cada acréscimo de 1 mg/L de eugenol).

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal ajustou-se a um modelo linear crescente em resposta a variação da concentração. NR variou entre 1,0 (valor mínimo) e 1,60 (valor máximo), indicando que aumentos na concentração da solução anestésica levam a redução do número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. Todavia, até o PCM de NI (20 mg/L) o número de animais que restabelecem o estado normal foi de 100%. Segundo o modelo ajustado, o ponto de máximo no qual se observa 100% de óbito (NI=4), ocorre a partir da dosagem de 90 mg/L de óleo de cravo.

Assim como o observado na avaliação da benzocaína, em todas as faixas etárias avaliadas tanto o aumento da concentração quanto o tempo de exposição ao eugenol influenciaram o tempo de retorno dos girinos, aumentando-a.

As concentrações indicadas para sedação de girinos de rã-touro nas diferentes faixas etárias encontram-se na Tabela 33.

TABELA 33 – Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição à benzocaína

Parâmetros	Faixa etária			
	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
Concentração (mg/L)	10,00	15,00	11,00	15,00
Tempo de retorno (min.)	32,48	19,17	8,41	16,50
Nº girinos induzidos (%)	100	100	80	100
Nº girinos retornaram (%)	100	100	100	100

Com exceção da faixa etária de 60 dias, nas demais faixas etárias avaliadas, para a seleção da concentração mais indicada à sedação dos girinos, optou-se pelas menores concentrações que induzissem o maior número de girinos, entre 96% a 100% da população amostral, e que proporcionassem o menor tempo de recuperação, em, no mínimo, 96% da amostra. Se na faixa etária de 60 dias fosse seguido o mesmo protocolo citado anteriormente, ou seja, que a concentração selecionada induzisse entre 96% a 100% da amostra à sedação, a concentração indicada seria de 14 mg/L de eugenol. Todavia, nessa dosagem o tempo de

recuperação dos girinos seria de 176,15 minutos, o que é inviável devido ao longo período de espera. Assim, optou-se por recomendar uma dosagem menor (11 mg/L), com 80% de eficiência em NI e com um tempo de retorno vinte vezes menor.

KING *et al.* (2005) afirmaram que as doses mais elevadas de óleo de cravo estão, em geral, associadas ao tempo de recuperação prolongado e ao aumento do risco de mortalidade.

Sladky *et al.* (2001) observaram que pacus (*Piaractus brachypomus*) submetidos à indução anestésica por meio de eugenol, nas concentrações de 100 mg/L e 200 mg/L, apresentaram tempo de recuperação superior a 10 minutos e necessitaram ser reanimados. GILDERHUS e MARKING (1987), SON *et al.* (2001) e PARK *et al.* (2003) consideram 10 minutos o limite máximo para o tempo de recuperação em peixes.

Neste trabalho, em geral, os girinos apresentaram tempo de recuperação bastante alto quando o comparado ao recomendado para peixes (máximo 10 minutos), todavia, nas concentrações indicadas, 100% dos animais restabeleceram o comportamento normal sem apresentar qualquer alteração visível ou óbito após um período de observação, pós-indução anestésica, de 24 horas.

Concentrações similares as recomendadas neste trabalho foram avaliadas por Simões (2009), durante a simulação de transporte de juvenis de tilápia-do-nilo. Segundo o autor para os peixes anestesiados com 9 e 18 mg/L de óleo de cravo o tempo máximo de transporte não deve ser superior a 24 horas.

Cooke *et al.* (2004), ao avaliarem o uso de diferentes concentrações de óleo de cravo para o manejo e transporte de *Micropterus salmonides*, concluíram que

para o transporte destes peixes as concentrações ideais variam entre 5 mg/L e 9 mg/L.

Concentrações menores de eugenol (2 mg/L e 5 mg/L), visando apenas tranquilizar os peixes durante o transporte foram recomendadas para juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e de matrinxã (*Brycon cephalus*) (KEENE et al., 1998; CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Iversen *et al.* (2003), ao analisarem a eficácia do óleo de cravo em salmão do Atlântico, verificaram a ocorrência de efeito anestésico somente em concentrações superiores a 30 mg/L e após 20 minutos de exposição.

De acordo com HOSKONEN e PIRHONEN (2004), a temperatura apresenta forte influência sobre o efeito anestésico do óleo de cravo em peixes. Os autores ao avaliarem o efeito do óleo de cravo em seis espécies de peixes (*Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Coregonus lavaretus*, *Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus*), em quatro diferentes temperaturas (5 °C, 10 °C, 15 °C e 20°C), observaram que o aumento da temperatura provocou a redução do tempo necessário para indução e recuperação dos peixes. Mylonas *et al.* (2005) e Park *et al.* (2008) ao avaliarem o efeito do óleo de cravo em *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* e em *Epinephelus bruneus*, respectivamente, observaram também, que em temperaturas maiores o tempo de recuperação foi menor.

5.2.3. Mentol

5.2.3.1. Faixa Etária: 30 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T₁), 15 mg/L (T₂), 20 mg/L (T₃), 25 mg/L (T₄) e 30 mg/L (T₅) de mentol.

A imersão em 10 mg/L de mentol, durante 60 minutos, induziu a sedação menos de 50% dos girinos (NI=2), resultado que se manteve nas observações seguintes, após 120min, 180min, 240min e 300min de imersão. Após 24 horas, 100% dos animais apresentavam comportamento normal (NI=1), ou seja, apresentavam resposta a estímulos externos.

Na segunda concentração avaliada (15 mg/L), o resultado observado na concentração anterior se manteve, menos de 50% dos animais foram induzidos à sedação (NI=2), após 60 minutos de imersão. Todavia, após 120 minutos, 100% dos animais foram sedados (NI=4), resultado que permaneceu inalterado por até 300 minutos, quando foi feita a penúltima observação. Após 24 horas, NI foi igual a três (NI=3), o que indica o retorno ao estado normal, de parte dos girinos sedados (menos de 50% da população amostral). Nas concentrações posteriores (20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de mentol), os girinos de rã-touro foram sedados logo após a imersão em solução aquosa e permaneceram nesse estado (100% sedados) por 300 minutos. Porém, a sedação por 24 horas só foi observado nos tratamentos T₄ (25 mg/L) e T₅ (30 mg/L).

A imersão dos girinos de rã-touro, nos cinco tratamentos avaliados, levou a sedação dos mesmos, por um período de até cinco horas, com o restabelecimento do comportamento normal em 100% dos animais. Todavia, a imersão dos girinos por um período de 24 horas resultou em não retorno (óbito) em mais de 50% e em 100% dos girinos sedados, nos tratamentos quatro (T₄) e cinco (T₅), respectivamente.

De acordo a equação de regressão ajustada de NI, o ponto de curvatura máximo (PCM) do mentol, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração de 16,33 mg/L. Na imersão de girinos de *L. catesbeianus* em concentrações inferiores a esse ponto (PCM), NI apresentou crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou.

Embora o aumento na concentração de mentol, acima do ponto de curvatura máximo não altere o NI, a elevação na concentração do anestésico, acima de PCM, levou a aumentos expressivos no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro, sendo esses valores iguais a 11,17 minutos (T_3), 30,00 minutos (T_4) e 53,00 minutos (T_5), respectivamente (FIGURA 55).

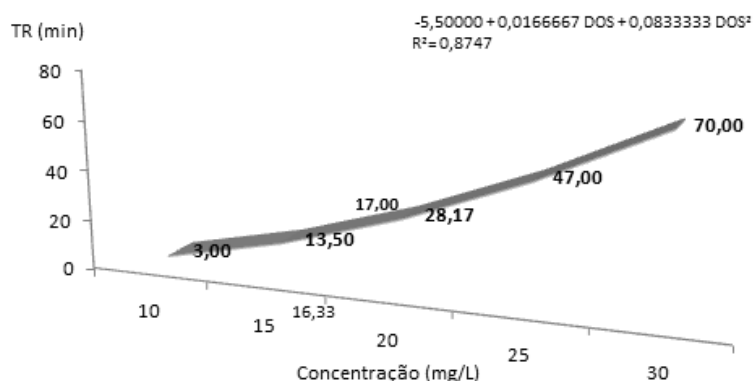


FIGURA 55 – Valores ajustados pela regressão do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 30 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de mentol.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 1,00 (valor mínimo) e 1,90 (valor máximo), indicando que acima do PCM, além do aumento expressivo no

TR dos girinos sedados, ocorre também uma redução em NR, chegando a perdas (óbito de girinos) de até 50% dos animais imersos.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, ajustou-se a um modelo quadrático em resposta a variação da concentração, com R^2 de 0,9429. NR inicialmente apresentou comportamento constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) até a dosagem 16,33 mg/L (ponto crítico de NI) e em seguida crescente, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. O ponto no qual se observou mais de 50% de óbito (NI=3), ocorreu na dosagem de 50 mg/L.

5.2.3.2. Faixa Etária: 45 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 10 mg/L (T_1), 15 mg/L (T_2), 20 mg/L (T_3), 25 mg/L (T_4) e 30 mg/L (T_5) de mentol.

A imersão em 10 mg/L de mentol durante 60min, 120min, 180min, 240min e 300min induziu a sedação menos de 50% da população amostral (NI=2) e, após 24 horas, 100% dos animais apresentavam comportamento normal (NI=1).

No tratamento T_2 (15 mg/L de mentol), assim como observado na concentração anterior, menos de 50% dos animais foram induzidos à sedação, após 60min, 120min e 180min de imersão. Nas observações posteriores, 240min e 300min de imersão, mais de 50% dos girinos encontravam-se sedados (NI=3) e ao final de 24 horas, 100% dos animais apresentavam comportamento normal (NI=1).

Nos demais tratamentos (20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L de mentol), os girinos de rã-touro foram sedados logo após a imersão em solução aquosa e permaneceram nesse estado (100% sedados) por 24 horas. Todavia, no tratamento T₅ a imersão dos girinos por um período superior a 300 minutos resultou em não retorno (óbito) em mais de 50% dos girinos sedados.

De acordo com a equação de regressão ajustada, o ponto de curvatura máximo (PCM) do mentol, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração de 21,94 mg/L. Na imersão de girinos de *L. catesbeianus*, com faixa etária de 45 dias, em concentrações inferiores a PCM, NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais ao ponto de curvatura máximo não levaram ao aumento do número de animais induzidos, indicando que a partir desse ponto, o NI se estabilizou. Embora aumentos na concentração de mentol, acima do ponto de curvatura máximo, não alterem o NI, estes causam aumentos expressivos no tempo de recuperação dos girinos de rã-touro, sendo esses valores iguais a 8,95 minutos (T₄) e 29,33 minutos (T₅), respectivamente (FIGURA 56).

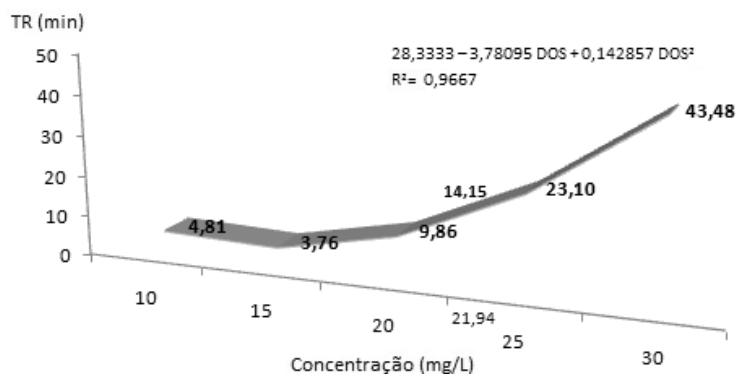


FIGURA 56 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias, após indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de mentol.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 0,93 (valor mínimo) e 1,63 (valor máximo), indicando que acima do PCM, além do aumento expressivo no TR dos girinos sedados, ocorre também uma redução, gradual e crescente, em NR.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, ajustou-se a um modelo quadrático em resposta a variação da concentração, com R^2 de 0,9667. NR apresentou tendência constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) nos três primeiros tratamentos e a partir de T_4 (25 mg/L), comportamento crescente, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. Todavia, na dosagem de 21,94 mg/L (máxima sedação) NR foi de 1,07, ou seja, 100% dos girinos sedados restabeleceram o comportamento normal. Segundo o modelo ajustado, o ponto no qual se observa mais de 50% de óbito (NI=3), ocorre na dosagem de 40 mg/L.

5.2.3.3. Faixa Etária: 60 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 15 mg/L (T_1), 20 mg/L (T_2), 25 mg/L (T_3), 30 mg/L (T_4) e 35 mg/L (T_5) de mentol.

A imersão em 15 mg/L de mentol por 60min induziu a sedação menos de 50% dos girinos. Após uma hora, mais de 50% dos animais não apresentavam resposta a estímulos externos (NI=3), estado mantido por 300 minutos.

Na segunda concentração avaliada (20 mg/L de mentol), após 60 minutos de imersão, 100% dos girinos encontrava-se sedados (NI=4), estado mantido por 300 minutos.

Nas concentrações seguintes (25 mg/L, 30 mg/L e 35 mg/L de mentol), 100% dos girinos de rã-touro foram sedados logo após a imersão em solução aquosa, estado mantido por 1440 minutos. Todavia, no tratamento T₅ a imersão dos girinos por um período de 24 horas resultou em não retorno (óbito) em mais de 50% dos girinos sedados.

O número de animais induzidos à sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear. De acordo a equação de regressão ajustada, o ponto de curvatura máximo (PCM) do mentol, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na dosagem de 22,50 mg/L. Na imersão de girinos de *L. catesbeianus* em concentrações inferiores a esse ponto (PCM), NI apresentou um crescimento linear, porém, valores maiores ou iguais não levaram ao aumento do número de animais induzidos à sedação, indicando que a partir desse ponto, NI se estabilizou. Embora aumentos na concentração de mentol, acima do ponto de curvatura máximo, não alterem o valor de NI, estes levam a aumentos expressivos no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro (FIGURA 57).

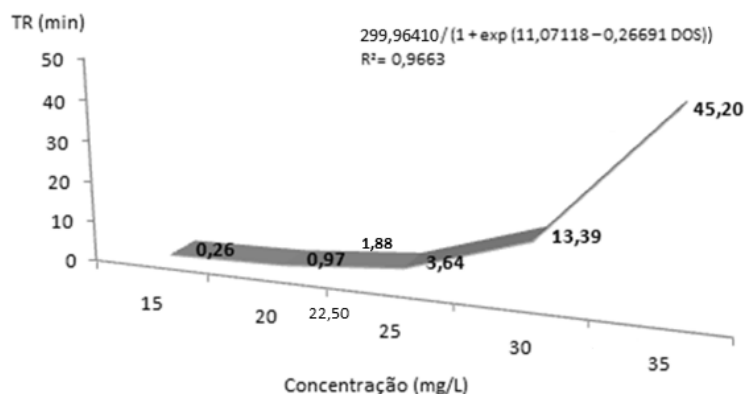


FIGURA 57 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias, após indução anestésica, por meio de imersão, em concentrações crescentes de mentol.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 0,90 (valor mínimo) e 1,59 (valor máximo), indicando que acima do PCM, além do aumento expressivo no TR dos girinos sedados, ocorre também uma redução gradual e crescente em NR.

O número de girinos que restabeleceram o comportamento normal, ajustou-se a um modelo quadrático crescente em resposta a variação da concentração. Todavia, NR apresentou tendência quase que constante (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) nos quatro primeiros tratamentos e a partir de T₅ (35 mg/L) comportamento crescente, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. Segundo o modelo, o ponto no qual se observa mais de 50% de óbito (NI=3), ocorre na dosagem de 45 mg/L de mentol.

5.2.3.4. Faixa Etária: 75 dias

Nesta faixa etária as concentrações utilizadas foram de 15 mg/L (T₁), 20 mg/L (T₂), 25 mg/L (T₃), 30 mg/L (T₄) e 35 mg/L (T₅) de mentol.

Após 60 minutos imersão em solução anestésica contendo 10 mg/L e 15 mg/L de mentol, 100% dos girinos encontravam-se sedados (NI=4), estado mantido nas observações posteriores (120min, 180min e 240min). Após 300 minutos de imersão menos de 50% dos girinos apresentavam-se sedados, resultado observado, também, após 24 horas de imersão.

A partir do tratamento T₃ (20 mg/L) 100% dos girinos foram induzidos a sedação logo após a imersão (NI=4), resultado que se manteve por 24 horas.

Com exceção dos tratamentos T₄ (25 mg/L) e T₅ (30 mg/L), em que, após 24 horas de imersão, observou-se o óbito de uma pequena porção dos animais sedados (NR=2) e de 100% (NR=4), respectivamente, nos demais tratamentos todos os animais sedados restabeleceram o comportamento normal (NI=1).

O número de animais induzidos à sedação (NI) ajustou-se a um modelo de platô de resposta linear. De acordo a equação de regressão ajustada, o ponto de curvatura máximo (PCM) do mentol, em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100% (NI=4), ocorreu na concentração igual a 21,67 mg/L. Embora aumentos na concentração de mentol, acima do ponto de curvatura máximo não alterem o NI, elevações na concentração de mentol, acima de PCM, levam a aumentos expressivos no tempo de recuperação (TR) dos girinos de rã-touro, sendo esses valores iguais a 10,13 minutos (T₄) e 32,68 minutos (T₅) (FIGURA 58).

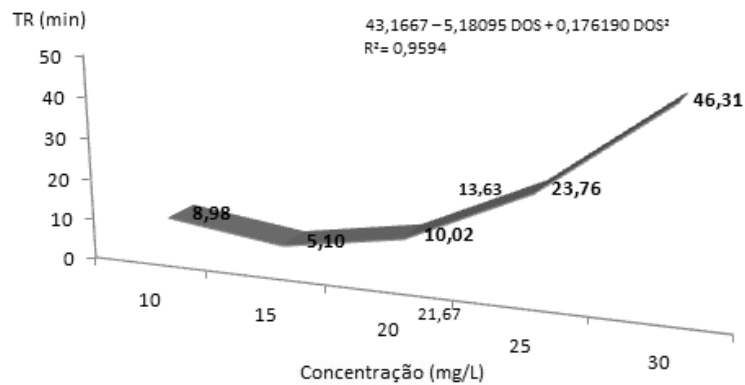


FIGURA 58 – Valores ajustados do tempo de retorno (TR), em minutos, necessário para o restabelecimento do comportamento normal de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias, após indução anestésica, por meio de imersão, em concentrações crescentes de mentol.

Nas cinco concentrações avaliadas, o NR variou entre 1,0 (valor mínimo) e 1,5 (valor máximo). NR apresentou tendência quase que constante nos três primeiros tratamentos (NR=1, 100% de retorno dos animais sedados) e a partir de T₃ (20 mg/L) comportamento crescente, reduzindo o número de girinos que restabeleceram o comportamento normal. Segundo o modelo ajustado, o ponto no qual se observa mais de 50% de óbito (NI=3), ocorre na dosagem de 45 mg/L.

Assim como o observado na avaliação da benzocaína e do eugenol, em todas as faixas etárias avaliadas tanto o aumento da concentração quanto o tempo de exposição ao mentol influenciaram no tempo de retorno dos girinos, aumentando-a.

Simões e Gomes (2009), após a exposição de juvenis de tilápia nilótica em 250 mg/L de mentol por 10min, 20min e 30min, constataram que o tempo de recuperação dos peixes expostos por 10 minutos é significativamente menor que o dos peixes expostos por 20min e 30min. Os mesmos autores ao avaliarem o tempo de retorno dos peixes expostos a 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L

e 300 mg/L de mentol observaram que a recuperação dos peixes expostos a 50 mg/L foi significativamente menor que a obtida nas demais concentrações avaliadas.

As concentrações indicadas para sedação de girinos de rã-touro, nas diferentes faixas etárias, encontram-se na Tabela 34.

TABELA 34 – Concentrações recomendadas para sedação de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), em diferentes faixas etárias, e tempo de retorno após 24 de exposição ao mentol

Parâmetros	Faixa etária			
	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias
Concentração (mg/L)	16,00	21,00	22,50	18,00
Tempo de retorno (min.)	16,00	11,93	2,00	7,00
Nº girinos induzidos (%)	100	100	100	100
Nº girinos retornaram (%)	100	100	100	100

Sartore *et al.* (2007), após avaliação do uso do mentol no transporte de alevinos de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), relataram que o tempo médio para o óbito dos alevinos nas concentrações de 0 mg/L, 50 mg/L, 1,00 mg/L, 1,50 mg/L, 2,00 mg/L, 4,00 mg/L e 8,00 mg/L de mentol foram, respectivamente, de 32,5min, 48,2min, 44,00min, 57,2min, 50,7min e 15,2min e concluíram que para o transporte a concentração ideal é de 6,5 mg/L de mentol.

De acordo com Simões e Gomes (2009) a margem de segurança do mentol para uma exposição prolongada (20min e 30min) é baixa. Todavia no presente estudo, após simulação de transporte por um período de 24 horas, a taxa de óbito maior ou igual a 50%, só foi observada em concentrações duas a três vezes maiores que a concentração recomendada, indicando que para girinos de rã-touro o mentol apresenta boa margem de segurança.

Concentrações mais elevadas foram recomendadas para outras espécies de peixes. Façanha e Gomes (2005), avaliando o uso do mentol em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), observaram que a concentração ideal para a sedação é a de 100 mg/L. Todavia, a mesma concentração de mentol foi recomendada para a indução à anestesia profunda, caracterizada pela perda total de tônus muscular e equilíbrio, em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus*) e tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (OLIVEIRA, 2009).

5.2.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol

Em todas as faixas etárias avaliadas, ao se observar o NI (número de animais induzidos à sedação) e o NR (número de animais que restabeleceram o comportamento normal após sedação) obtido na avaliação dos três compostos anestésicos, observamos valores semelhantes entre os mesmos.

5.2.4.2. Faixa Etária: 30 dias

Nos tratamentos T₃ (20 mg/L) e T₄ (25 mg/L) da benzocaína tanto o NI quanto o NR encontrados foram semelhantes aos encontrados no T₃ do mentol (20 mg/L), indicando que nessas concentrações a benzocaína e o mentol têm efeitos similares. Valores semelhantes foram observados ao se comparar as concentrações de 15

mg/L de benzocaína e 5 mg/L de eugenol; e 30 mg/L de benzocaína e 15 mg/L de eugenol.

O eugenol e o mentol apresentaram resultados semelhantes, quanto a NI e NR, nos tratamentos T₄ e T₅ cujas concentrações foram de 20 mg/L e 25 mg/L de eugenol e 25 mg/L e 30 mg/L de mentol.

Analisando os três compostos observamos que o eugenol apresentou maior NI nas concentrações iniciais (5 mg/L, 10 mg/L e 15 mg/L), igualando-se aos outros dois nas dosagens posteriores, em que o NI foi máximo para todos os compostos; e menor PCM, induzido 100% dos girinos a sedação com menor concentração de anestésico (FIGURA 59).

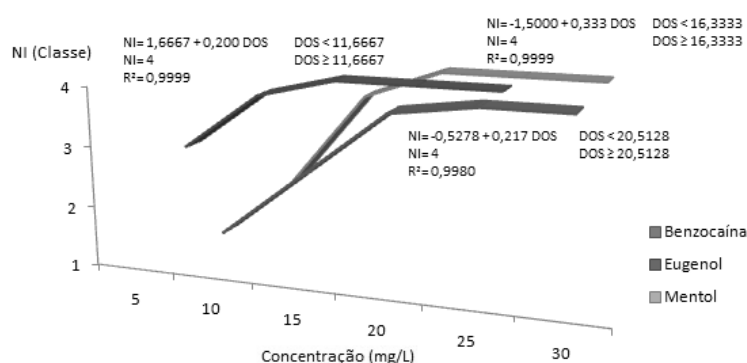


FIGURA 59 – Valores ajustados pela regressão do número de girinos de *L. catenbeianus*, na faixa de 30 dias, induzidos à sedação, em função da concentração para a variável anestésico. NI: 1= 0%; 2= -50%; 3= +50%; 4= 100%.

A benzocaína e o mentol apresentaram comportamento semelhante em T₁ (10 mg/L), induzido a sedação menos de 50% dos girinos. Em T₂ o mentol começa a se sobressair sobre a benzocaína e em T₄ os compostos voltam a se igualar (NI=4, 100% de girinos sedados).

Tanto a benzocaína quanto o eugenol e o mentol, nas concentrações iniciais (5 mg/L, 10 mg/L e 15 mg/L), apresentaram valores semelhantes quanto a NR. A partir de 20 mg/L, o NR do eugenol passa a se sobressair, reduzindo gradativamente o número de animais que restabeleceram o comportamento normal. O mentol e a benzocaína passam a diferir a partir de 25 mg/L, com dominância do mentol (FIGURA 60).

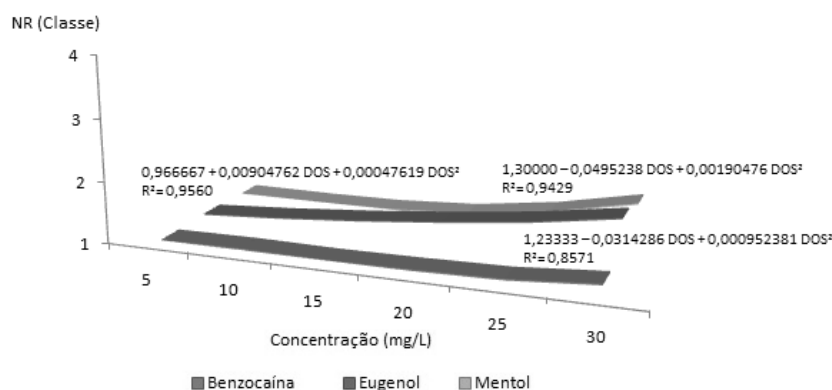


FIGURA 60 – Valores ajustados do número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa de 30 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária. NI: 1= 0%; 2= -50%; 3= +50%; 4= 100%.

Com relação a TR, ao se comparar os três anestésicos observamos que os animais imersos em eugenol apresentaram um maior tempo de retorno, sendo equiparável ao mentol e à benzocaína apenas na concentração igual a 5 mg/L, em que, o TR foi semelhante ao observado nas concentrações de 10 mg/L de benzocaína e mentol, ou seja 2min, 4min e 3min, respectivamente. Nas concentrações de 15 mg/L (13 minutos) e 30 mg/L (70 minutos), os tempos de retorno do mentol foram próximos aos observados para a benzocaína (25 mg/L) e para o eugenol (20 mg/L), sendo iguais a 11min e 68min, respectivamente. Todavia,

embora o TR tenha sido próximo para o mentol e o eugenol, o número de animais que retornaram ao estado normal foi diferente, sendo observado um NR menor que 100%, porém, maior que 50% na imersão de girinos de rã-touro em 30 mg/L de mentol, o que não foi observado quando utilizado o eugenol (20 mg/L), em que o NR foi de 100% (TABELA 35).

TABELA 35 – Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de animais (NR), em porcentagem, de girinos de *Lithobates catesbeianus*, na faixa etária de 30 dias, que retornaram ao estado normal após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol

Benzocaína			Eugenol			Mentol		
Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR
10	4	1	5	2	1	10	3	1
15	5	1	10	32	1	15	13	1
20	8	1	15	55	1	20	28	1
25	11	1	20	68	1	25	47	2
30	16	1	25	74	1	30	70	2

NR: 1=100%; 2= + 50%

Ao analisar todos os parâmetros avaliados (NI, TR e NR), observamos que a benzocaína e o mentol foram os compostos anestésicos mais eficientes na a indução à sedação de girinos de rã-touro, na faixa etária de 30 dias. Uma vez que, embora o eugenol tenha sido mais eficiente quando analisamos apenas o NI, apresentando um ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos a sedação foi de 100%, menor do que o encontrado para a benzocaína e para o mentol (11,67 mg/L, 20,51 mg/L e 16,33 mg/L, respectivamente), ao

avaliarmos os parâmetros, NI e TR, em conjunto, observamos que neste ponto (PCM), o TR do óleo de cravo (40,28 minutos) foi superior ao da benzocaína (8,27 minutos) e do mentol (16,99 minutos).

Na Tabela 36 estão apresentadas as equações de regressão ajustadas de TR e NR em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária.

TABELA 36 – Equações de regressão ajustadas do tempo de retorno (TR) e número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa etária de 30 dias, que retornaram ao estado normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico

Anestésico	Variável	Equações Ajustadas	R ²
1	TR	$45,98421 / (1 + \exp (3,41182 - 0,09237 \text{ DOS}))$	0,9947
	NR	$1,23333 - 0,0314286 \text{ DOS} + 0,000952381 \text{ DOS}^2$	0,8571
2	TR	$-37,1667 + 8,65476 \text{ DOS} - 0,169048 \text{ DOS}^2$	0,8305
	NR	$0,966667 + 0,00904762 \text{ DOS} + 0,00047619 \text{ DOS}^2$	0,9560
3	TR	$-5,50000 + 0,0166667 \text{ DOS} + 0,0833333 \text{ DOS}^2$	0,8747
	NR	$1,30000 - 0,0495238 \text{ DOS} + 0,00190476 \text{ DOS}^2$	0,9429

1= Benzocaína; 2= Eugenol; 3= Mentol

5.2.4.2. Faixa Etária: 45 dias

Tanto a benzocaína quanto o eugenol e o mentol, nos três últimos tratamentos (20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L; 15 mg/L, 20 mg/L e 25 mg/L; 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L, respectivamente), induziram a sedação 100% dos girinos logo após a imersão, estado que se manteve por até 5 horas, com o restabelecimento do

comportamento normal de 100% dos animais sedados, com exceção dos tratamentos T₄ (20 mg/L) e T₅ (25 mg/L) do eugenol cujo NR, após 300 minutos, em ambos os casos, foi menor que 100%, porém, maior que 50% (NR= 2) e o T₅ (30 mg/L) do mentol cujo NR, à semelhança do relatado anteriormente para o eugenol, foi igual a dois (NR= 2). Após 24 horas de imersão, o NR em alguns casos foi de 100% (NR= 1), como o observado nos tratamentos T3 (20 mg/L) e T4 (25 mg/L) da benzocaína, e no T3 (20 mg/L) do mentol. Todavia, nos demais tratamentos, o NR observado foi classificado em dois (mais de 50% retornaram ao estado normal) e quatro (100% óbito) (TABELA 37).

FIGURA 37 – Número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), após 24 horas indução anestésica por meio de imersão em concentrações crescentes de benzocaína,

Benzocaína		Eugenol		Mentol	
Concentração (mg/L)	NR	Concentração (mg/L)	NR	Concentração (mg/L)	NR
20	1	15	2	20	1
25	1	20	4	25	2
30	2	25	4	30	4

NR:1= 100%; 2= + 50%;3= -50%; 4= 0%

Nos tratamentos T₁ (10 mg/L) do mentol e T₂ (15 mg/L) da benzocaína e do eugenol (10 mg/L), mais de 50% dos girinos de rã-touro foram induzidos a sedação, estado que se manteve por até 5 horas, com o restabelecimento do comportamento normal de 100% dos animais sedados. Tanto a imersão em benzocaína quanto em eugenol induziu 100% dos girinos à sedação por 24 horas, todavia, após esse período apenas a benzocaína apresentou 100% de retorno dos animais imersos

sedação uma parcela dos girinos (menos de 50%, NI= 2), enquanto que o T₁ da benzocaína não surtiu efeito (NI= 1).

Ao analisar os anestésicos, com relação apenas a NI, observamos que embora eles tenham apresentado comportamento semelhante o eugenol foi mais eficiente, apresentando um ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos a sedação é igual a 100% (NI= 4), menor do que o encontrado para a benzocaína e para o mentol, 16,00 mg/L; 21,00 mg/L e 21,94 mg/L, respectivamente.

Com relação a TR, ao se comparar os três anestésicos observamos que os valores são bastante semelhantes em alguns casos. O TR do mentol, nas concentrações de 10 mg/L (5 minutos) e 15 mg/L (4 minutos) foram próximos aos observados para a benzocaína (10 mg/L) e para o eugenol (5 mg/L), 4min e 3min, respectivamente (TABELA 38). Valores semelhantes foram também encontrados nos tratamentos T₃ do mentol (20 mg/L) e da benzocaína (20 mg/L) e na T₂ do eugenol (10 mg/L) cujos valores foram de 10min, 12min e 9min, assim como, nos tratamentos T₅ da benzocaína (30 mg/L) e T₃ do eugenol (15 mg/L), em que o TR foi de 18min e 19min, respectivamente.

TABELA 38 – Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de girinos de *Lithobates catesbeianus*, na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em porcentagem, após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas

Benzocaína			Eugenol			Mentol		
Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR
10	4	1	5	3	1	10	5	1
15	7	1	10	9	1	15	4	1

20	12	1	15	19	1	20	10	1
25	16	1	20	34	2	25	23	1
30	18	1	25	52	2	30	43	2

NR: 1=100%; 2= + 50%

Embora nos primeiros tratamentos o TR dos três anestésicos tenha sido semelhante, no geral, considerando todos os tratamentos, a benzocaína apresentou menor TR e ausência de mortalidade (NR= 1), ao contrário do observado nos outros dois anestésicos, em que o eugenol assim como o mentol, apresentou um aumento significativo em TR, além de não retorno de parte dos animais induzidos (NR= 2) nos últimos tratamentos.

Ao analisar todos os parâmetros avaliados (NI, TR e NR), observamos que a benzocaína e o mentol foram os compostos anestésicos mais eficientes na indução à sedação de girinos de rã-touro, na faixa etária de 45 dias. Uma vez que, embora o eugenol tenha sido mais eficiente quando analisamos apenas o NI, apresentando um ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos à sedação foi de 100%, menor do que o encontrado para a benzocaína e para o mentol (16,00 mg/L, 21,00 mg/L e 21,94 mg/L, respectivamente), ao avaliarmos os parâmetros, NI e TR, em conjunto, observamos que neste ponto (PCM), o TR do óleo de cravo (21,70 minutos) foi superior ao da benzocaína (13,15 minutos) e do mentol (14,15 minutos).

Na Tabela 39 encontram-se as equações de regressão ajustadas do tempo de retorno e número de girinos de *L. catesbeianus* que restabeleceram o comportamento normal função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária.

TABELA 39 – Equações de regressão ajustadas do tempo de retorno (TR) e número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa etária de 45 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico

Anestésico	Variável	Equações Ajustadas	R ²
1	TR	$20,13237 / (1 + \exp (3,50830 - 0,19715 \text{ DOS}))$	0,9754
	NR	$1,233333 - 0,0314286 \text{ DOS} + 0,000952381 \text{ DOS}^2$	0,8571
2	TR	$1,16667 - 0,0500000 \text{ DOS} + 0,08333333 \text{ DOS}^2$	0,8638
	NR	$0,783333 + 0,0366667 \text{ DOS}$	0,8643
3	TR	$28,3333 - 3,78095 \text{ DOS} + 0,142857 \text{ DOS}^2$	0,9778
	NR	$1,73333 - 0,103333 \text{ DOS} + 0,00333333 \text{ DOS}^2$	0,9667

1= Benzocaína; 2= Eugenol; 3= Mentol

5.2.4.3. Faixa Etária: 60 dias

Nos tratamentos T₁ da benzocaína (10 mg/L) e do eugenol (15 mg/L), o NI após 60min, 120min, 180min e 240min foi semelhante (2, 3, 4 e 4, respectivamente). Todavia, após 300 minutos, 100% dos girinos induzidos pela benzocaína restabeleceram o comportamento normal, enquanto que, os girinos induzidos pelo eugenol permaneceram sedados. O mentol apresentou semelhanças quanto ao NI apenas nas duas primeiras horas, não induzindo 100% dos animais a sedação. Quanto ao NR, nos três tratamentos, 100% dos girinos restabeleceram o comportamento normal (NR=1).

Nos tratamentos T₄ e T₅ da benzocaína, T₂ a T₅ do eugenol e T₂ a T₅ do mentol, o NI foi igual a quatro, ou seja, 100% dos girinos foram sedados, porém, o NR apresentou diferenças de acordo com a concentração e o composto utilizado. Apenas a benzocaína e o eugenol, ambos na concentração de 30 mg/L,

apresentaram comportamento semelhante. O tempo de retorno assim como o NR variou de acordo com a concentração do composto utilizado. O tempo mínimo observado para que os girinos sedados restabelecessem o comportamento normal foi de 5 minutos e o máximo de 25 minutos.

Embora as concentrações utilizadas para indução anestésica, por meio do eugenol (10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L), tenham sido menores do que as utilizadas para a benzocaína e para o mentol (15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L e 35 mg/L), ao se comparar os três anestésicos observa-se que os valores de NI são semelhantes em alguns casos. O número de animais induzidos à sedação pela benzocaína, nas concentrações de 20 mg/L (NI= 2,7) e 25 mg/L (NI= 3,2), foram próximos aos encontrados no mentol e no eugenol, nas concentrações de 15 mg/L (NI=2,5) e 10 mg/L (NI=3,2), respectivamente. Valores semelhantes foram também encontrados entre os tratamentos T₄ (30 mg/L) e T₅ (35 mg/L) da benzocaína e os tratamentos T₂ (15 mg/L) e T₃ (20 mg/L) do eugenol e T₂ (20 mg/L) e T₃ (25 mg/L) do mentol.

Ao analisar os anestésicos, com relação apenas a NI, observamos que, nesta faixa etária (60 dias), o eugenol foi mais eficiente, apresentando um ponto de curvatura máximo (PCM), em que o número de animais induzidos a sedação é igual a 100% (NI= 4), menor do que os encontrados para a benzocaína e para o mentol (15,00 mg/L, 35,00 mg/L e 22,50 mg/L, respectivamente) (FIGURA 62).

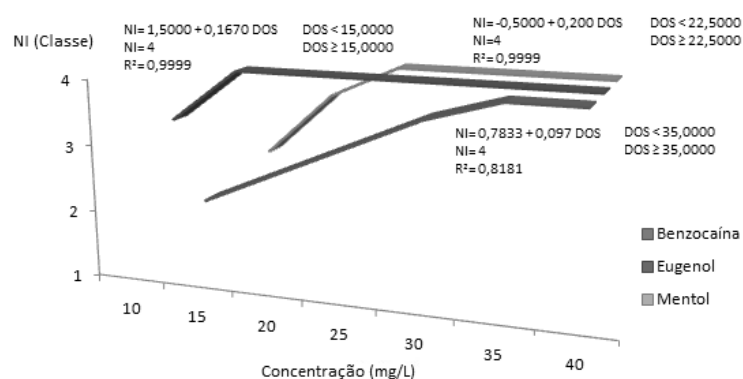


FIGURA 62 – Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 60 dias, induzidos à sedação, por meio de imersão, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária. NI: 1= 0%; 2= - 50%; 3= + 50%; 4= 100%.

Com relação a TR, ao se comparar os três anestésicos observamos que sedação dos girinos por meio do eugenol foi eficaz apenas no tratamento T₁ (10 mg/L) com TR de 8 minutos e retorno de 100% dos animais. Nos demais tratamentos a indução anestésica levou a óbito mais de 50% dos girinos sedados (T₂), chegando a extremos de 100% de não retorno (T₃, T₄ e T₅). O TR do mentol, nas concentrações de 25 mg/L (4min) e 30 mg/L (13min) foram próximos aos valores observados nos tratamentos T₄ (30 mg/L) e T₅ (35 mg/L) da benzocaína, cujos valores foram de 6min e 16min, respectivamente (TABELA 40).

TABELA 40 – Tempo de retorno (TR), em minutos, e número de girinos de *Lithobates catesbeianus*, na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em porcentagem, após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas

Benzocaína			Eugenol			Mentol		
Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR	Concentração (mg/L)	TR (min)	NR
10	8	100%	10	8	100%	10	8	100%
15	10	50%	15	10	50%	15	10	50%
20	12	0%	20	12	0%	20	12	0%
25	14	0%	25	14	0%	25	4	0%
30	16	0%	30	16	0%	30	13	0%
35	18	0%	35	18	0%	35	16	0%
40	20	0%	40	20	0%	40	18	0%

15	-	1	10	8	1	15	-	1
20	-	1	15	179	3	20	-	1
25	-	1	20	180	4	25	4	1
30	6	1	25	180	4	30	13	1
35	16	2	30	180	4	35	45	2

NR: 1=100%; 2= + 50%

Ao analisar todos os parâmetros avaliados (NI, TR e NR) observamos que, nesta faixa etária, a benzocaína e o mentol nas concentrações de 30 mg/L e 22 mg/L, respectivamente, foram os agentes anestésicos mais eficientes na indução à sedação de girinos de rã-touro. Ambos induziram 100% dos animais à sedação (NI=4); obtiveram 100% de retorno dos animais avaliados (NR=1) e TR de 5,78min e 2min (benzocaína e mentol, respectivamente). A benzocaína induziu 100% dos animais à sedação logo após a exposição dos girinos ao fármaco, estado mantido por 24 horas. O mentol cujo tempo de indução (TI) necessário para sedar 100% dos indivíduos foi de 60 minutos, manteve os girinos sedados por 5 horas. O eugenol embora tenha apresentado bons resultados na concentração de 10 mg/L, induzindo mais de 50% dos girinos a sedação (NI=3) e com TR de 8 minutos, sedou menos de 50% dos animais na primeira hora.

Na tabela 41 encontram-se as equações de regressão ajustadas do tempo de retorno e número de girinos de *L. catesbeianus* que restabeleceram o comportamento normal função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária.

TABELA 41 – Equações de regressão ajustadas de tempo de retorno (TR) e número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico

Anestésico	Variável	Equações Ajustadas	R ²
1	TR	$50,0000 / (1 + \exp(18,15435 - 0,57980 \text{ DOS}))$	0,9913
	NR	$2,00952 - 0,109524 \text{ DOS} + 0,00285714 \text{ DOS}^2$	0,9821
2	TR	$180,18617 / (1 + \exp(20,00000 - 1,69836 \text{ DOS}))$	0,9999
	NR	$-23,8268 + 11,8552 \text{ DOS} \frac{1}{2} - 1,24499 \text{ DOS}$	0,9113
3	TR	$179,96410 / (1 + \exp(11,07118 - 0,26691 \text{ DOS}))$	0,9663
	NR	$2,65714 - 0,163810 \text{ DOS} + 0,00380952 \text{ DOS}^2$	0,8571

Anestésico: 1= Benzocaína; 2= Eugenol; 3= Mentol

5.2.4.4. Faixa Etária: 75 dias

Nos tratamentos avaliados tanto o NI quanto o NR da benzocaína foram semelhantes ao do mentol, com exceção do NR observado após 24 horas de indução, em 30 mg/L de solução anestésica, cujos valores foram de dois (+ 50%) e quatro (0%), respectivamente. O não restabelecimento do comportamento normal dos girinos ocorreu com maior incidência ao se utilizar o eugenol, por um período de 24 horas de imersão.

O eugenol diferiu do mentol e da benzocaína, quanto ao NI, apenas no tratamento T2, onde 100% dos animais permaneceram sedados por 300 minutos, em contraste ao observado nos outros dois anestésicos, onde o tempo de sedação foi de 240 minutos.

De acordo com a equação de regressão ajustada, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária, observamos que, nesta faixa etária (75 dias), não houve diferenças expressivas de NI entre os compostos avaliados (FIGURA 63).

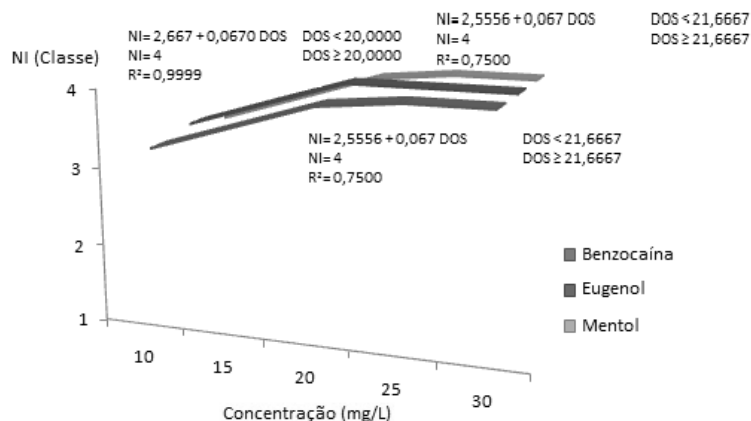


FIGURA 63 – Valores ajustados do número de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), na faixa etária de 75 dias, induzidos à sedação, por meio de imersão, em função da concentração para as variáveis anestésico e faixa etária. NI: 1= 0%; 2= - 50%: 3= + 50%: 4= 100%.

Quanto ao NR, na concentração de 10 mg/L, os três compostos apresentaram comportamentos semelhantes, sem diferenças expressivas. A partir de T₂ (15 mg/L), eugenol passa a se sobressair, enquanto que a benzocaína e o mentol mantêm o comportamento semelhante, que se altera apenas em T₄ (25 mg/L) (FIGURA 64).

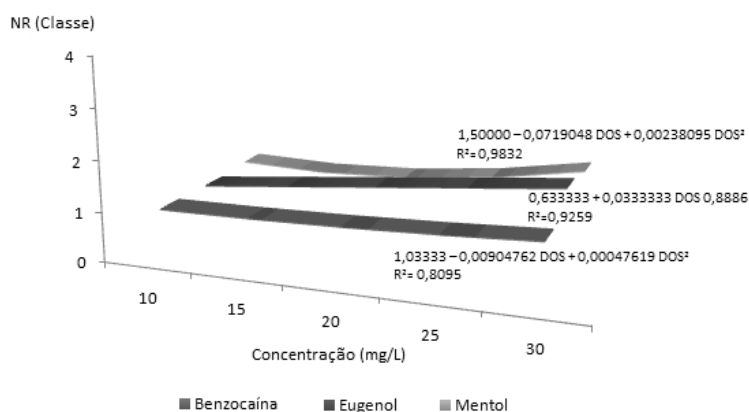


FIGURA 63 – Valores ajustados do número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa de 75 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica, em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária. NI: 1= 0%; 2= -50%; 3= +50%; 4= 100%.

Nas dosagens de 15 mg/L, 20 mg/L e 25 mg/L de eugenol, o NR foi equivalente ao observado nas concentrações de 20 mg/L, 25 mg/L e 30 mg/L de mentol, respectivamente.

Com relação a TR, no geral a benzocaína apresentou os menores tempos de recuperação e o eugenol os maiores. Porém, ao se comparar os três anestésicos observamos algumas semelhanças entre eles. O TR da benzocaína, nas concentrações de 10 mg/L (5 minutos), 15 mg/L (8 minutos) e 30 mg/L (22 minutos) foram próximos aos valores observados nos tratamentos T₂ (15 mg/L), T₃ (20 mg/L) e T₄ (25 mg/L) da mentol, cujos valores foram de 5min, 10min e 24min, respectivamente (TABELA 42). Valores de TR semelhantes foram observados nos tratamentos T₄ (25 mg/L) de benzocaína e T₂ (15 mg/L) do eugenol, cujos valores foram de 18min e 17min, respectivamente. Tempos de retorno semelhantes, entre os três anestésicos, ocorreram apenas nos tratamentos T₂ do mentol e T₁ da benzocaína e do mentol.

TABELA 42 – Tempo de retorno (TR), em minutos, de *Lithobates catesbeianus*, na faixa etária de 75 dias, que restabeleceram o comportamento normal após indução anestésica por meio de imersão em cinco concentrações crescentes (mg/L) de benzocaína, eugenol e mentol, de acordo com as equações de regressão ajustadas

Benzocaína		Eugenol		Mentol	
Concentração (mg/L)	TR (min)	Concentração (mg/L)	TR (min)	Concentração (mg/L)	TR (min)
10	5	10	5	10	9
15	8	15	17	15	5
20	13	20	28	20	10
25	18	25	39	25	24
30	22	30	50	30	46

Ao analisar todos os parâmetros avaliados (NI, TR e NR) observamos que, nesta faixa etária, a benzocaína e o mentol foram os agentes anestésicos mais eficientes na indução à sedação de girinos de rã-touro. No PCM de NI, em o número de animais sedados é máximo, tanto a benzocaína quanto o mentol obtiveram 100% de retorno dos animais anestesiados (NR=1) e TR próximos, 14,99 minutos e 13,63 minutos, respectivamente.

Na Tabela 43 encontram-se as equações de regressão ajustadas do tempo de retorno e número de girinos de *L. catesbeianus* que restabeleceram o comportamento normal em função da concentração para as variáveis, anestésico e faixa etária.

TABELA 43 – Equações de regressão ajustadas de tempo de retorno (TR) e número de girinos de *L. catesbeianus*, na faixa etária de 60 dias, que restabeleceram o comportamento normal (NR), em função da concentração (DOS) e da variável anestésico

Anestésico	Variável	Equações Ajustadas	R ²
1	TR	$50,0000 / (1 + \exp (18,15435 - 0,57980 \text{ DOS}))$	0,9913
	NR	$2,00952 - 0,109524 \text{ DOS} + 0,00285714 \text{ DOS}^2$	0,9821
2	TR	$180,18617 / (1 + \exp (20,00000 - 1,69836 \text{ DOS}))$	0,9999
	NR	$-23,8268 + 11,8552 \text{ DOS} \frac{1}{2} - 1,24499 \text{ DOS}$	0,9113
3	TR	$179,96410 / (1 + \exp (11,07118 - 0,26691 \text{ DOS}))$	0,9663
	NR	$2,65714 - 0,163810 \text{ DOS} + 0,00380952 \text{ DOS}^2$	0,8571

Anestésico: 1= Benzocaína; 2= Eugenol; 3= Mentol

Logo, em todas as faixas etárias avaliadas, os agentes anestésicos mais eficientes para sedação de girinos de rã-touro por 24 horas foram a benzocaína e o mentol. Tanto a concentração recomendada como também o tempo de retorno, de

ambos os anestésicos, foram bastante semelhantes a partir da faixa etária de 60 dias (FIGURA 65).

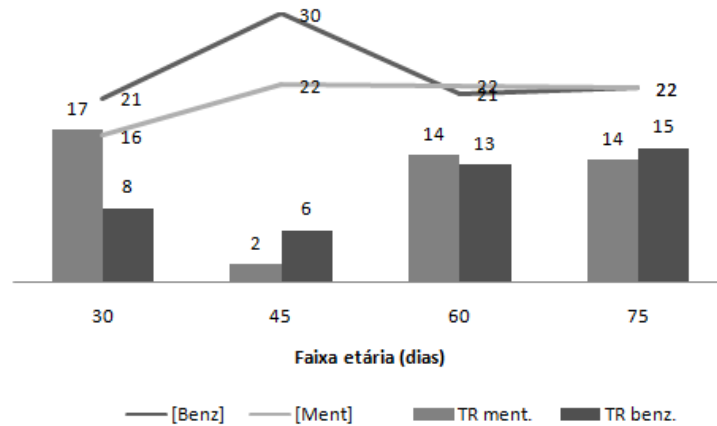


FIGURA 65 – Gráfico comparativo das concentrações recomendadas (mg/L) e dos respectivos tempos de recuperação (minutos) entre a benzocaína e o mentol.

Nas faixas etárias de 30 e 45 dias a concentração da benzocaína recomendada para sedação foi, respectivamente, 24% e 27% maior que o de mentol. Porém, aos 30 dias de idade, o tempo de recuperação dos girinos por meio da benzocaína foi duas vezes menor do que o TR obtido na sedação por meio de mentol e, aos 45 dias de idade, o mentol apresentou TR três vezes menor do que o da benzocaína.

Assim, uma vez que, a eficácia de ambos anestésicos foi comprovada, ora um apresentando melhores resultados ora outro (mesmo que pequenos), a escolha entre um ou outro fica a critério do operador, este deve avaliar, então, questões como facilidade de aquisição e preço e optar pelo mais vantajoso.

5.3. FASE 2 – IMAGOS, JUVENIS E ADULTOS

Em todos os testes realizados, independente da classe de peso avaliada e do anestésico utilizado, a reação das rãs-touro, ao primeiro contato com o anestésico, foi de hiperatividade, seguida de concentração dos animais em uma das extremidades, sobreposições e tentativas de fuga. Após a hiperatividade inicial, à medida que o anestésico começava a se estabelecer observou-se redução gradativa dos movimentos gulares (MovG), seguida de redução gradual do reflexo de fuga (ReF), do equilíbrio (EqL), da nocicepção à dor leve (NocL), do tônus muscular e da nocicepção à dor profunda (NocP).

A hiperatividade inicial observada foi igualmente relatada para juvenis de zebrafish (*Danio rerio*), pintado (*Pseudorasbora parva*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) e, também, para reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon cephalus*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatã (*Prochilodus lineatus*) e trairão (*Hoplias lacerdae*) (GRUSH *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2007b, VIDAL *et al.*, 2008; VALENTE *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2009). Segundo Collins (1978), a hiperatividade é o primeiro comportamento observado em um animal induzido a anestesia.

Para anfíbios, uma descrição clara dos estágios de indução anestésica e dos sinais fisiológicos e comportamentais não foi encontrada na literatura.

Assim, com base nos resultados obtidos, e de acordo com as respostas fisiológicas (número de movimentos gulares realizados no intervalo de um minuto) e comportamentais, caracterizadas por presença ou ausência de reflexo de fuga, equilíbrio, nocicepção leve e nocicepção profunda, e considerando, também, a velocidade de resposta aos estímulos, de 1200 rãs, da espécie *Lithobates catesbeianus*, recém-metamórficas e pós-metamórficas em idade reprodutiva, foi estabelecida a primeira classificação e identificação dos estágios progressivos de sedação e anestesia em anuros, por meio da descrição de sinais fisiológico e comportamentais (TABELA 44).

TABELA 44 – Classificação, identificação e descrição dos sinais fisiológicos e comportamentais dos estágios progressivos de sedação e anestesia em anuro, *Lithobates catesbeianus*

Classe	Identificação	Descrição
--------	---------------	-----------

A1	Sedação Leve	Redução do reflexo de fuga; Perda parcial do equilíbrio; Movimentos gulares normais (MovG=1) ou reduzidos (MovG=2);
A2	Sedação Profunda	Perda total do reflexo de fuga e perda parcial ou total do equilíbrio; Movimentos gulares normais (MovG=1) ou reduzidos (MovG=2);
B1	Anestesia Leve	Ausência de reflexo de fuga; Ausência de equilíbrio; Movimentos gulares reduzidos (MovG=2) Sinais de leve analgesia;
B2	Anestesia Profunda	Ausência de reflexo de fuga; Ausência de equilíbrio; Movimentos gulares baixo (MovG= 3) ou ausente (MovG=4) Insensibilidade a dor leve;
B3	Anestesia Cirúrgica	Ausência de reflexo de fuga; Ausência de equilíbrio; Ausência de movimentos gulares (MovG=4); Insensibilidade a dor profunda;
C	Colapso	Overdose; Tempo excessivo; Dosagem muito alta;

5.3.1. Benzocaína

5.3.1.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 60 mg/L (T₂), 70 mg/L (T₃), 80 mg/L (T₄) e 90 mg/L (T₅) de benzocaína.

Em todos os tratamentos a sedação leve (A₁) e a sedação profunda (A₂), caracterizadas, principalmente, por reduções no reflexo de fuga e perda parcial e/ou

total do equilíbrio, e a anestesia leve (B_1), evidenciada pela ausência de reflexo de fuga e equilíbrio e leve analgesia, foram observadas em 100% da população amostral.

A anestesia profunda (B_2) e cirúrgica (B_3) foram observadas a partir do tratamento T_3 (70 mg/L de benzocaína) em que, 70% dos animais apresentavam ausência de reflexo de fuga e, também, de equilíbrio, insensibilidade a dor leve e número reduzido de movimentos gulares ($MovG=3$), entre 6 a 36 movimentos/minuto. Os 30% restantes foram induzidos apenas a anestesia leve.

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir na eficácia de um anestésico, resultando em não indução anestésica ou indução de uma pequena parcela da população. Entretanto, é pouco provável que fatores abióticos como temperatura, pH e salinidade, tenham interferido nos resultados levando a não indução dos animais, uma vez que, todos os animais utilizados em cada um dos tratamentos, foram alocados ao mesmo tempo no interior das respectivas caixas plásticas contendo solução anestésica previamente homogeneizada. Dentre os fatores biológicos que poderiam interferir na ação de um anestésico citam-se variação individual (genética), tamanho ou peso, maturidade sexual, condição corporal (conteúdo de reserva corporal), estado de saúde e estresse (ROUBACH *et al.*, 2002; KING *et al.*, 2005; ROSS e ROSS, 2008).

Cecala *et al.* (2007) ao compararem as dosagens recomendadas de MS-222 (triclaína metano sulfonato) e Orajel[®], cujo princípio ativo é a benzocaína, para a anestesia de anfíbios, constataram influência positiva da massa no tempo de indução em *Bufo fowleri* e *Desmognathus fuscus*.

Velasco-Santamaria *et al.* (2008) ao avaliarem a eficácia anestésica de quatro diferentes anestésicos (2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina e MS-222) em alevinos e juvenis de *Piaractus brachypomus*. Segundo os autores tanto em alevinos quanto em juvenis o tempo de indução, nos quatro anestésicos avaliados, é dependente da concentração utilizada e relataram ainda que, em juvenis expostos a concentrações mais altas de benzocaína, quinaldina e 2-fenoxietanol o tempo de indução foi significativamente maior quando comparado com alevinos sob as mesmas condições experimentais.

Excluindo a variação de peso e tamanho, visto que todos os animais utilizados apresentavam-se na mesma faixa de peso e tamanho, existindo pouca variação entre eles (peso médio= $7,15 \pm 1,21$ g; comprimento rostro-cloacal médio= $43,48 \pm 2,21$ mm) e a influência da maturidade sexual, uma vez que se trata de imagos recém-metamórficos, ainda longe do início da maturidade sexual, restam apenas a condição corporal, o estado de saúde, o estresse e a variação individual (genética).

Uma vez que todos os animais utilizados foram criados no mesmo local com baixa densidade de estocagem (100 animais/baia), permitindo a todos livre acesso ao alimento, e sob as mesmas condições de manejo sanitário, profilático e alimentar (ração com 36% PB, ad libitum), acredita-se que se houve diferenças entre eles, com respeito à condição corporal, estado de saúde e nível de estresse, provavelmente, essas variações são do próprio indivíduo devido à variabilidade fisiológica e não devido a fatores abióticos.

Assim, supõe-se que a não indução dos 30% dos animais ao estágio B₂ tenha ocorrido devido a fatores biológicos do próprio indivíduo, sendo esses animais, provavelmente, mais resistentes a ação do fármaco.

A anestesia cirúrgica, caracterizada pela ausência de reflexo de fuga, ausência de equilíbrio, ausência de movimentos gulares (MovG=4) e insensibilidade a dor profunda, foi observada em 10% dos animais. Assim como no caso anterior, supõe-se que esse resultado tenha ocorrido devido a variações individuais, sendo esses animais (10% da população amostral), nesse caso, provavelmente, mais sensíveis a ação do anestésico.

No tratamento T₄ (80 mg/L de benzocaína) tanto a sedação leve quanto a sedação profunda e a anestesia leve foram atingidos por 100% da população amostral, enquanto que, a anestesia profunda e a anestesia cirúrgica foram observadas em 90% da população. Nessa concentração, 40% da população amostral, mantida em solução anestésica por 300 minutos (dois animais), vieram a óbito, após terem atingido o estágio definido como colapso.

Embora o manejo dos animais tenha sido o mesmo, a variação genética existente entre indivíduos pode ter levado um ou outro animal a se adaptar melhor as condições de criação e, conseqüentemente, a obterem melhores condições corporais (reserva lipídica), levando-os a atingirem um estado mais avançado de anestesia (overdose), uma vez que, a benzocaína, devido a suas propriedades químicas, é um composto altamente solúvel em gordura.

Segundo Ross e Ross (2008), em animais mais velhos e/ou com maiores reservas de gordura corporal e em fêmeas em reprodução, a recuperação dos

animais induzidos a anestesia, por meio da benzocaína, pode ser prolongada devido à lenta metabolização e eliminação do anestésico das reservas lipídicas.

Outro fator que pode ter levado os animais a morte é a hipóxia, uma vez que, durante os estágios mais profundos de anestesia (anestesia cirúrgica) a respiração pulmonar é cessada, sendo compensada apenas pela respiração cutânea, embora, em anfíbios, a apneia seja frequentemente observada nos estágios mais profundos de anestesia e, em geral, sem grandes prejuízos a vida do animal (LAFORTUNE, *et al.*, 2001; GENTZ, 2007; MITCHELL, 2009; MITCHELL *et al.*, 2009). Talvez, se durante o período de indução a solução anestésica tivesse sido aerada, assegurando o teor de saturação de oxigênio, os animais não viessem a óbito.

Na dosagem seguinte, 90 mg/L de benzocaína, todos os estágios anestésicos, com exceção do colapso (estágio C), foram alcançados por 100% da população amostral. O estágio C foi observado em 50% dos animais, justamente aqueles que foram mantidos em solução anestésica mesmo após alcançarem o estágio de anestesia cirúrgica (300 minutos). Provavelmente, nesse caso o colapso dos animais tenha ocorrido devido ao tempo excessivo em que ficaram imersos em solução anestésica, visto que, os animais que foram retirados e colocados em água pura logo após alcançarem o estágio de anestesia cirúrgica, não vieram a óbito.

Os tempos de indução (TI) aos estágios de sedação (leve e profunda) e anestesia (leve, profunda e cirúrgica) ajustados pela regressão, em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 45.

TABELA 45 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5 a 10 gramas, em função da concentração de benzocaína, em mg/L

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
50	20	36	68	-	-
60	20	28	57	-	-
70	20	23	46	62	-
80	20	20	35	79	113
90	20	20	24	83	113

Os tempos de indução se ajustaram a diferentes modelos, incluindo modelos lineares e não lineares com R^2 (coeficiente de determinação) mínimo de 0,7177 e máximo de 0,9949, indicando que as alterações na concentração de benzocaína explicam no mínimo 71,8% e no máximo 99,5% das alterações nos tempos de indução.

Os tempos de indução à sedação leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada o valor de TI foi igual à média, ou seja, a 20 minutos.

Valente (2009) avaliando o uso de benzocaína na indução à anestesia de reprodutores de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) e curimatá (*Prochilodus lineatus*), pelo método de aspersão branquial, relatou também a não influencia da concentração anestésica no tempo de indução.

Os tempos de indução à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático decrescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos da concentração de benzocaína levam a redução do tempo de indução, 0,40 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína.

Trabalhos que corroboram como os resultados obtidos foram relatados por Oliveira (2009) ao avaliar a eficiência da benzocaína na indução anestésica de

reprodutores de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) e de matrinxã (*B. cephalus*), por meio da técnica de imersão. De acordo com o autor, em ambas as espécies, o tempo de indução apresentou comportamento quadrático decrescente, indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a redução do tempo de indução.

Os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo linear decrescente, em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos da concentração de benzocaína levam a redução do tempo de indução, 1,10 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína.

Oliveira (2009), Gimbo *et al.* (2008), Vidal *et al.* (2007) e Inoue *et al.* (2002) ao avaliarem o tempo de indução à anestesia, por meio do uso de diferentes concentrações de benzocaína, em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), juvenis de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) e juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*), respectivamente, apresentaram resultados que confirmam os obtidos, tempo de indução maior nas concentrações iniciais com redução linear com o aumento da dosagem anestésica.

Os tempos de indução a anestesia profunda ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7177. TI apresentou comportamento inicial crescente até a concentração de 90 mg/L, indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a aumentos expressivos em TI (1,05 minutos/mg/L de benzocaína), e em seguida, decrescente indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a redução de TI (1,74 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína) (FIGURA 66).

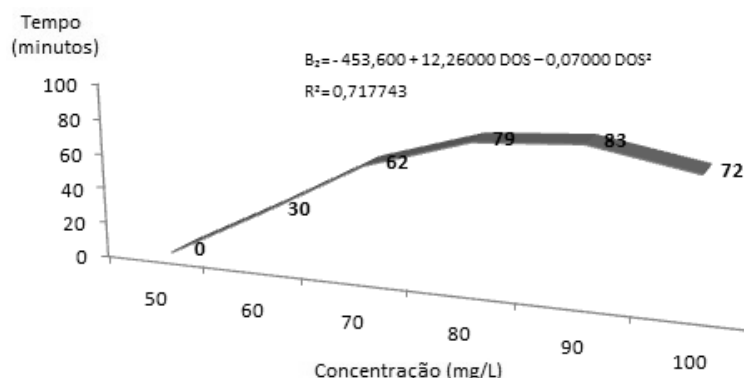


FIGURA 66 – Valores ajustados do tempo de indução à anestesia profunda de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre cinco e dez gramas, induzidos por meio de concentrações crescentes de benzocaína.

Oliveira (2009), ao avaliar o tempo de indução à anestesia profunda e cirúrgica, por meio do uso de diferentes concentrações de eugenol, em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) adultos, relatou padrão semelhante para a resposta de TI em função do aumento da concentração do óleo de cravo. Todavia, o mesmo autor, ao avaliar o tempo de indução à anestesia profunda em reprodutores de matrinxã, por meio do uso de diferentes concentrações de mentol e benzocaína, relatou o comportamento quadrático decrescente de TI em razão do aumento da dosagem anestésica.

Os tempos de indução à anestesia cirúrgica ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9877. Segundo o qual, o ponto de curvatura máxima, que indica o início da estabilização, ocorreu na dosagem de 75,69 mg/L. Assim, a partir desse ponto aumentos na concentração de benzocaína não levam a alterações significativas no tempo de indução.

Inoue (2005) ao analisar a resposta de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) a ação de diferentes anestésicos, entre eles a benzocaína, observou que à medida que se aumentava a dose do anestésico, o tempo de indução ao estágio 3, caracterizada pela perda total do equilíbrio e incapacidade de voltar à posição normal, diminuía, porém, a partir de uma determinada concentração (60 mg/L de benzocaína) os tempos de indução passaram a não apresentar diferenças significativas em relação às doses mais altas.

Os tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 46.

TABELA 46 – Tempos de manutenção à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) ajustados pela regressão em função da concentração de benzocaína, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
50	298	297	297	-	-
60	298	297	297	-	-
70	298	297	297	135	-
80	298	297	297	279	270
90	298	297	297	293	300

Os tempos de manutenção à sedação leve, sedação profunda e anestesia leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada os valores de TM foram iguais à média, ou seja, a 298min, 297min e 297min, respectivamente.

Os tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se a modelos não linear sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. Em

ambos os casos, o ponto de curvatura máxima ocorreu entre as dosagens de 70 mg/L e 80 mg/L (76,95 mg/L, em B₂ e 79,58 mg/L, em B₃). Logo, a partir do tratamento T₄ os tempo de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica não apresentaram diferenças significativas.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 47.

TABELA 47 – Tempos de retorno, em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) ajustados pela regressão, em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
50	56	40	25	10	-	-
60	53	34	22	13	-	-
70	56	35	24	15	3	2
80	63	45	32	19	7	4
90	76	61	45	22	11	5

De acordo com os modelos de regressão ajustados, com exceção da anestesia cirúrgica onde a partir de T₄ (80 mg/L) os tempos de retorno passaram a não apresentar diferenças significativas em relação às doses mais altas, nos demais estágios, os tempos de retorno apresentaram comportamento crescente, aumentando com o aumento da dosagem de anestésico. Trabalhos que corroboram com estes resultados obtidos foram relatados para alevinos de quinguios e lambaris,

induzidos à anestesia por meio de benzocaína e, também, para reprodutores de pacu, induzidos a anestesia profunda e cirúrgica por meio de imersão em benzocaína (BITTENCURT *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2009).

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (5g a 10g), a dosagem de 80 mg/L de benzocaína pode ser utilizada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) uma vez que, essa dosagem apresentou 100% de eficácia na indução a todos os estágios anestésicos, além de menor tempo de retorno e tempos de indução e manutenção próximos aos obtidos nas dosagens adjacentes, todavia, para coleta de amostras teciduais, amputações, instalação de microchips para identificação e rastreamento (subcutâneo) e cirurgias em geral como, por exemplo, laparoscopia, gonadectomia, ovariectomia e endoscopia, em que estágios mais profundos de anestesia são necessários (anestesia profunda e cirúrgica), essa dosagem pode não ser a mais adequada devido não só ao longo período de exposição necessário para que os animais alcancem esses estágios (1h53min) como também em razão do longo período de recuperação (1h). Possivelmente, nessas circunstâncias, o uso de dosagens maiores fosse mais indicado, uma vez que, existem relatos na literatura relacionando maiores dosagens anestésicas a menores tempos de recuperação, em razão do menor tempo de exposição (GONÇALVES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2001; OSTRENSKY *et al.*, 2000).

Para o manejo comum, do dia a dia, como triagem, pesagem e mensuração dos animais, em que a apenas a sedação é necessária, não só para facilitar o manejo dos operadores como também para evitar possíveis fraturas, a dosagem de 50 mg/L de benzocaína pode ser utilizada, permitindo a manutenção dos animais imersos em solução anestésica por até 297min, sem que estes alcancem os

estágios de anestesia profunda e cirúrgica, e com o restabelecimento do comportamento normal após 56 minutos.

Na literatura encontrada com respeito à sedação e anestesia de anfíbios, as recomendações referem-se, em geral, a apenas duas fases de vida, a larval (pré-metamórfica e aquática) e a adulta (pós-metamórfica e terrestre), sem a especificação do peso, tamanho ou espécie. Nesses trabalhos os autores recomendam o uso de benzocaína em concentrações que variam entre 0,003% a 0,01%, para anfíbios na fase larval, e de 0,01% a 0,5% para anfíbios adultos (CRAWSHAW, 1992; MACHIN, 1999; WRIGHT, 2001; BROWN *et al.*, 2004; CAKIR e STRAUCH, 2005; CROOK e WHITEMAN, 2006; IACUC, 2008), valores bem superiores ao recomendado para esta classe de peso. Possivelmente, essas diferenças se devam a variações de existentes, principalmente, entre espécies, peso e/ou idade dos animais avaliados e o estágio anestésico desejado.

Cecala *et al.* (2007) ao avaliarem o uso de Orajel[®], cujo principio ativo é a benzocaína, em quatro espécies de anfíbios (*Acris crepitans*, *Ambystoma talpoideum*, *Bufo fowleri* e *Desmognathus fuscus*) relataram a existência de diferenças significativas no tempo de indução e de recuperação dos animais entre as espécies.

5.3.1.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 75 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 125 mg/L (T₄) e 150 mg/L (T₅) de benzocaína.

Com exceção do tratamento T₁, em que a anestesia profunda e cirúrgica não foi alcançada, e do tratamento T₂, em que a anestesia profunda e cirúrgica foi observada em 50% da população amostral, nos demais tratamentos (T₃, T₄ e T₅) todos os estágios anestésicos (A₁ a B₃) foram alcançados por 100% dos indivíduos amostrados.

O colapso (estágio C) foi observado a partir da dosagem de 125 mg/L em que 40% da população amostral (dois animais), mantida em solução anestésica por 300 minutos, vieram a óbito. Assim como citado anteriormente (classe de peso 1), provavelmente, o óbito dos animais seja resultado de hipóxia ou variação individual, ou seja, animais mais sensíveis à benzocaína. No tratamento T₅, todos os animais mantidos imersos por 300 minutos atingiram o colapso e vieram a óbito. Neste caso, supõe-se que a exposição por tempo excessivo tenha sido a causa mais provável para o óbito dos animais, uma vez que, os animais retirados da solução anestésica logo após indução à anestesia cirúrgica restabeleceram-se completamente.

Cakir e Strauch (2005) durante um estudo comparativo entre MS-222 (tricaína metano sulfonato), benzocaína e pentobarbital para indução anestésica de *Rana pipiens*, pesando entre 40-60 gramas, observaram que a imersão das rãs em solução contendo 200 mg/L de benzocaína resultava em apnéia e relataram a necessidade de assistência respiratória para evitar a morte dos animais.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação leve e profunda e à anestesia leve, profunda e cirúrgica, em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 48.

TABELA 48 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte a trinta gramas, em função da concentração de benzocaína, em mg/L

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
50	38	92	116	-	-
75	25	45	61	70	80
100	18	24	28	87	109
125	17	19	18	72	110
150	22	25	31	36	91

Os tempos de indução à sedação leve e profunda e a anestesia leve ajustaram-se a modelos quadráticos decrescentes em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos da concentração de benzocaína levam a reduções no tempo de indução.

Oliveira (2009), ao induzir, por meio de imersão em solução de benzocaína, reprodutores de tilápia (*O. niloticus*) e de matrinxã (*B. cephalus*), à anestesia cirúrgica e profunda, respectivamente, relatou, também, o comportamento quadrático decrescente do tempo de indução.

Os tempos de indução à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) ajustaram-se a modelos raiz quadrada em resposta à variação da concentração, com R² de 0,8312 e 0,7837, respectivamente. Tanto em B₂ quanto em B₃, TI apresentou comportamento crescente até as dosagens de 100 e 125 mg/L, respectivamente, e em seguida decrescente (FIGURA 67).

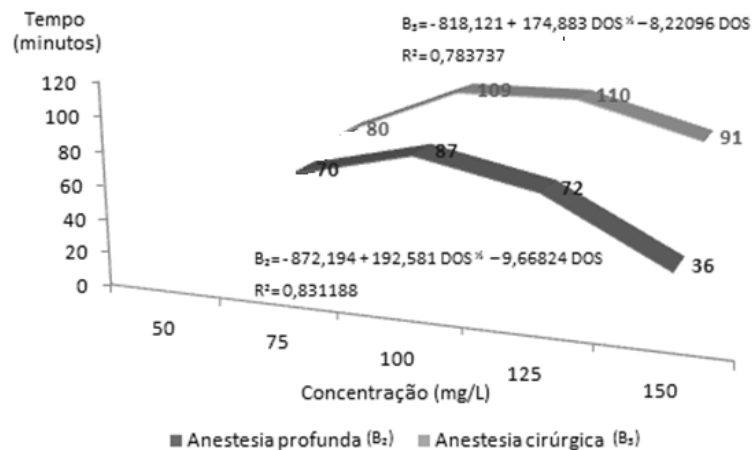


FIGURA 67 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de benzocaína, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte e trinta gramas.

Assim, em todos os estágios anestésicos avaliados, os animais submetidos a concentrações mais baixas de benzocaína levaram mais tempo para alcançar o estágio esperado do que nas maiores concentrações. Trabalhos que corroboram com os resultados encontrados foram descritos por Okamoto *et al.* (2009), ao avaliarem a eficácia da benzocaína e do eugenol como anestésico para juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*), assim como por Bittencourt *et al.* (2009) e Gimbo *et al.* (2008) ao avaliarem o uso de benzocaína na indução anestésica de quinguios (*Carassius auratus*) e lambaris (*Astyanax altiparanae*), respectivamente.

Os tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) ajustados pela regressão em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 49.

TABELA 49 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte a trinta gramas, em função da concentração de benzocaína, em mg/L

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
50	300	300	283	-	-
75	300	300	296	150	150
100	300	300	302	300	300
125	300	300	302	300	300
150	300	300	299	300	300

Os tempos de manutenção à sedação leve e à sedação profunda foram constantes, assim, independente da concentração utilizada os valores de TM foram iguais à média, ou seja, a 300 minutos, em ambos os casos.

Os tempos de manutenção à anestesia leve ajustaram-se a um modelo raiz quadrada em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9113. TM apresentou comportamento inicial crescente, com taxa de aumento de 0,52 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína, entre os tratamentos T₁ e T₂. Porém, a partir da dosagem de 75 mg/L TM passou a apresentar a tendência à estabilidade, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos.

Os tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. Em ambos os casos, aumentos na concentração de benzocaína, até a dosagem de 80 mg/L, levaram a aumentos expressivos no tempo de manutenção. No entanto, após essa dosagem, ou seja, a partir de T₃, não foram constatadas diferenças

significativas nos tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica entre os tratamentos.

Os tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína, encontram-se na Tabela 50.

TABELA 50 – Tempos de retorno, em minutos, dos diferentes estágios anestésicos, de imagos de *Lithobates catesbeianus*, pesando entre vinte a trinta gramas, em função da concentração de benzocaína, em mg/L

Concentração (mg/L)	Estado normal	Retorno (minutos)				
		A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
50	44	20	8	-	-	-
75	129	100	77	26	12	8
100	165	136	110	55	34	21
125	152	128	106	55	34	21
150	89	76	65	55	34	21

Com exceção dos tratamentos T1, em que devido à baixa concentração utilizada apenas a sedação foi alcançada, e T₂ em que embora a anestesia profunda e cirúrgica tenham sido atingidas, o tempo de manutenção foi inferior aos tratamentos seguintes (150 minutos, em ambos os estágios), influenciando dessa forma no tempo de retorno, reduzindo-o. Nos demais tratamentos, o tempo necessário para que os animais recuperassem o estado normal foi maior nas concentrações menores do que nas maiores. Uma hipótese para explicar o ocorrido pode ser atribuída ao fato de que, quanto maior o tempo necessário para o animal atingir o estágio anestésico B₃ (anestesia cirúrgica), maior o tempo de exposição ao

anestésico e, conseqüentemente, maior o tempo necessário para o restabelecimento dos animais. Esta redução do tempo de recuperação com o aumento da concentração da solução anestésica foi relatada por Oliveira (2009), Gonçalves *et al.* (2008), Gomes *et al.* (2001) e Ostrensky *et al.* (2000).

Os tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve e à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração. Nos três casos. TR apresentou comportamento crescente até a dosagem de 100 mg/L (2,26 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína), e em seguida decrescente (1,21 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de benzocaína), indicando que aumentos na concentração levam a redução do tempo de retorno.

Os tempos de retorno à anestesia leve, profunda e cirúrgica ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. Nos três modelos ajustados o tempo de retorno à anestesia apresentou aumentos expressivo nas dosagens iniciais (T_1 e T_2) com tendência à estabilidade nas últimas (T_3 a T_5). Após a dosagem de 80 mg/L (ponto de curvatura máximo nos três modelos ajustados), aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de retorno.

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (20g a 30g), a concentração de 150 mg/L de benzocaína pode ser utilizada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) uma vez que, apresentou 100% de eficácia na indução a todos os estágios anestésicos, além de menor tempo de retorno e tempos de indução e manutenção próximos aos obtidos nas dosagens de 100 mg/L e 125 mg/L. Todavia, para manejos mais invasivos como

coleta de amostras teciduais, amputações e cirurgias em geral (laparoscopia, gonadectomia, ovariectomia e endoscopia), em que estágios mais profundos de anestesia são necessários (anestesia profunda e cirúrgica), essa dosagem pode não ser a mais adequada devido não só ao longo período de exposição necessário para que os animais alcancem esses estágios (1h30min) como também em razão do longo período de recuperação (1h30min). Possivelmente, nessas circunstâncias, o uso de dosagens maiores fosse mais indicado, uma vez que, existem relatos na literatura relacionando maiores dosagens anestésicas a menores tempos de recuperação, em razão do menor tempo de exposição (GONÇALVES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2001; OSTRENSKY *et al.*, 2000).

A marcação individual segundo a metodologia de Martof (1953), caracterizada pela amputação dos dedos e artelhos, em geral é feita durante a fase de imago e sem qualquer analgésia. Assim, para uma leve analgésia, a imersão prévia dos animais em solução contendo 150 mg/L de benzocaína por 30min é recomendável.

Para o manejo comum, do dia a dia (triagem, pesagem e mensuração) e até mesmo para transporte, em que a apenas a sedação é necessária, não só para facilitar o manejo dos operadores como também para evitar possíveis fraturas, a dosagem de 50 mg/L de benzocaína pode ser utilizada, permitindo a manutenção dos animais imersos em solução anestésica por até 283min ou 377 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h), sem que estes alcancem os estágios de anestesia profunda e cirúrgica, e com o restabelecimento do comportamento normal após 44 minutos.

5.3.1.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 60 mg/L (T₁), 80 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 120 mg/L (T₄) e 140 mg/L (T₅) de benzocaína.

Nos dois primeiros tratamentos (T₁ e T₂) a concentração utilizada foi eficaz na indução dos animais aos estágios A₁ A₂ e B₁, sedando 100% da população amostral, contudo, para os estágios mais profundos de anestesia (B₂ e B₃), ambas as dosagens não foram capazes de induzir uma parcela representativa da população amostral, em razão da baixa concentração anestésica utilizada.

No tratamento seguinte (100 mg/L de benzocaína), 100% dos animais alcançaram os estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve, e 90% da população alcançaram o estágio B₂, possivelmente, os 10% (um indivíduo) não anestesiados fossem mais resistentes à ação do fármaco (variação individual). Nesse tratamento a anestesia cirúrgica também não foi atingida, devido a baixa dosagens anestésica utilizada.

No tratamento T₄ todos os estágios anestésicos de sedação (A₁ e A₂) e os estágios de anestesia B₁ e B₂ foram observados em 100% da população amostral, enquanto que, a anestesia cirúrgica foi atingida por 80% dos indivíduos, possivelmente, os 20% (dois indivíduos) não anestesiados fossem mais resistentes à ação do fármaco (variação individual).

No tratamento T₅, os estágios A₁ (sedação leve) a B₂ (anestesia profunda) foram alcançados por 100% da população amostral enquanto que, o estágio de anestesia cirúrgica foi atingido por 90% dos indivíduos. Nessa concentração, 60% da população amostral, mantida em solução anestésica por 300 minutos (três animais), vieram a óbito, atingindo o estágio definido como colapso. Provavelmente, o tempo

excessivo de exposição ao anestésico tenha induzido os animais a hipóxia levando-os a óbito. Possivelmente, se a solução anestésica fosse aerada, assegurando o teor de saturação de oxigênio, os animais não viessem a óbito.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 51.

TABELA 51 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre oitenta a cem gramas

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
60	20	67	83	-	-
80	20	56	69	-	-
100	20	44	54	53	-
120	20	33	39	56	84
140	20	22	25	57	118

Os tempos de indução (TI) à sedação leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada os valores de TI foram iguais à média, ou seja, a 20 minutos.

Os tempos de indução à sedação profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos lineares decrescentes em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos da concentração de benzocaína levam a reduções expressivas no tempo de indução (0,56min/mg/L, em A₂ e 0,73 min/mg/L, em B₁).

Os tempos de indução à anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8531 e 0,9999, respectivamente.

Na indução à anestesia profunda, o ponto de curvatura máxima ocorreu na dosagem de 92,24 mg/L, indicando que a partir dessa dosagem o TI começou a estabilizar (TI= 50,41 minutos). Assim, a partir do tratamento T₃ onde parcela representativa da população alcançou o estágio de anestesia profunda, aumentos na dosagem anestésica não levam a alterações significativas em TI.

O mesmo foi observado na indução à anestesia cirúrgica, porém, a partir da concentração de 122,58 mg/L, onde TI foi de 102,92 minutos. Após essa dosagem TI estabiliza em 118 minutos.

Os tempos de manutenção à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 52.

TABELA 52 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de benzocaína, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre oitenta a cem gramas

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
---------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

Manutenção (minutos)					
60	300	267	254	-	-
80	300	287	285	-	-
100	300	299	295	237	-
120	300	303	299	296	240
140	300	299	299	305	270

Os tempos de manutenção (TM) à sedação leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada os valores de TM foram iguais à média, ou seja, a 300 minutos.

Os tempos de manutenção à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático crescente, nas concentrações iniciais (T_1 e T_2) indicando que aumentos na concentração de benzocaína levam a aumentos no tempo manutenção (1min/mg/L de benzocaína), e em seguida tendência à estabilidade (TI= constante=300min).

Os tempos de manutenção aos três estágios de anestesia (anestesia leve, anestesia profunda e anestesia cirúrgica) se ajustaram a modelos não linear sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. De acordo com os respectivos modelos ajustados, B_1 , B_2 e B_3 passam a estabilizar nas dosagens de 64 mg/L (TM= 264min), 107 mg/L (TM= 270min) e 120 mg/L (240min), respectivamente. Logo, a partir dessas concentrações TM passa a apresentar valores constantes ao longo dos tratamentos.

Os tempos de retorno (TR) à sedação e à anestesia, em função da concentração de benzocaína, encontram-se na Tabela 53.

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
60	54	16	-	-	-	-
80	120	37	-	-	-	-
100	167	75	34	28	9	-
120	195	121	114	33	34	17
140	203	158	134	33	61	48

Ao contrário do observado anteriormente, nesta classe de peso, à medida que se aumentou a concentração de benzocaína, o tempo necessário para o restabelecimento completo dos animais também aumentou. No tratamento T₂, por exemplo, o tempo de retorno a sedação leve de foi 2,44 vezes maior que a de T₁, enquanto que o tempo de recuperação de T₁ foi cinco vezes menor que a observada em T₅. Em alguns casos, dependendo do estágio anestésico avaliado, essas diferenças chegam a valores até dez vezes maiores ou menores.

Okamoto *et al.* (2009) ao submeter juvenis do pampo (*T. marginatus*) a diferentes concentrações de benzocaína observaram que os peixes expostos a dosagens mais baixas levaram mais tempo para atingir o estágio de anestesia cirúrgica do que a maior concentração, enquanto que o tempo de recuperação apresentou padrão inverso, ou seja, com o aumento da concentração anestésica, o autores observaram o aumento do tempo necessário para o restabelecimento dos animais.

O retorno dos demais estágios anestésicos (sedação leve e profunda e anestesia leve, profunda e cirúrgica) ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. Logo, os tempos de retorno apresentaram tendência à estabilização, todavia, em A_1 e B_2 a estabilidade só foi observada a partir das dosagens de 150 mg/L e 144 mg/L, respectivamente. Assim, nos tratamentos avaliados, os tempos de retorno à sedação leve e à anestesia profunda apresentaram comportamento crescente. Nos demais estágios anestésicos, a partir de 122 mg/L (A_2), 100 mg/L (B_1) e 125 mg/L (B_3) TR apresenta tendência à estabilidade, apresentando valores constantes e independentes da dosagem anestésica.

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (80g a 100g), a concentração a de 120 mg/L de benzocaína pode ser utilizada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) uma vez que, apresentou 100% de eficácia na indução a todos os estágios anestésicos, além de menor tempo de indução e manutenção próximos aos obtidos nas dosagens de 100 mg/L e 140 mg/L. Todavia, para manejos mais invasivos como coleta de amostras teciduais, amputações e cirurgias em geral (laparoscopia, gonadectomia, ovariectomia e endoscopia), em que estágios mais profundos de anestesia são necessários (anestesia profunda e cirúrgica), essa dosagem pode não ser a mais adequada devido não só ao longo período de exposição necessário para que os animais alcancem esses estágios (84min) como também em razão do longo período de recuperação (195min). Possivelmente, nessas circunstâncias, o uso de dosagens maiores fosse mais indicado, uma vez que, existem relatos na literatura relacionando maiores dosagens anestésicas a menores tempos de recuperação, em razão do

menor tempo de exposição (GONÇALVES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2001; OSTRENSKY *et al.*, 2000).

Dosagens semelhantes, variando entre 0,01% a 0,03% de benzocaína, foram recomendadas para as espécies *Rana pipiens* e *Ambystoma trigrinum nebulosum* por Cakir e Strauch (2005) e Crook e Whiteman (2006), respectivamente, e relataram, também, um longo período de recuperação, entre 69,3min a 78,3min.

Para a sedação, a dosagem de 60 mg/L pode ser utilizada por até 254min ou 338 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h), com a completa recuperação dos animais em 54 minutos.

5.3.1.4. Classe de Peso 4 (120g – 160g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 60 mg/L (T₁), 80 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 120 mg/L (T₄) e 140 mg/L (T₅) de benzocaína.

No tratamento T₁, 100% e 90% da população amostral foram induzidos aos estágios de sedação leve e sedação profunda, porém, a mesma eficiência não foi observada para a indução ao primeiro estágio anestesia (anestesia leve, B₁), alcançada por apenas 10% dos indivíduos, possivelmente, os mais sensíveis à ação do fármaco.

A dosagem seguinte (80 mg/L de benzocaína), no entanto, mostrou-se eficiente não só para a indução à sedação (leve e profunda) como também para a anestesia leve, sedando e anestesiando 100% dos indivíduos. Todavia, para o

estágio B₂, o tratamento T₂, não surtiu o efeito desejado, anestesiando apenas 30% da população.

Os tratamentos seguintes (100 mg/L, 120 mg/L e 140 mg/L) foram eficientes na indução à sedação e aos estágios de anestesia B₁ (anestesia leve) e B₂ (anestesia profunda), induzindo 100% dos animais utilizados. Porém, nenhuma das concentrações citadas foi capaz de aprofundar de forma eficiente a anestesia até o estágio B₃ (anestesia cirúrgica), uma vez que, não induziram uma parcela representativa da população (acima de 60%), anestesiando apenas 10%, 20% e 30% dos indivíduos, respectivamente.

Todavia, o uso de dosagens maiores (160 mg/L de benzocaína) levaram a óbito cerca de 80% da população amostral. Como nessa concentração tanto os animais mantidos por 300 minutos em solução anestésica quanto os que foram retirados, logo após alcançarem o estágio B₃, vieram a óbito, possivelmente, o colapso tenha sido causado pelo uso de dose excessiva de anestésico, não sendo influenciado pelo tempo de exposição.

Os tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 54.

TABELA 54 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
60	49	71	70	-	-
80	36	67	69	-	-
100	26	57	67	67	-
120	21	42	66	67	-
140	20	22	65	67	-

Os tempos de indução à sedação leve e profunda ajustaram-se a modelos quadráticos decrescentes em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos da concentração de benzocaína levam a reduções em TI.

Os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração, apresentando comportamento praticamente constante, sem diferenças significativas em TI ao longo dos tratamentos.

Os tempos de indução à anestesia profunda se ajustaram a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. Segundo o qual a partir da dosagem de 83,34 mg/L, em que TI foi de 59min, aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de indução (estabilização).

Como exposto anteriormente, nenhuma das concentrações avaliadas foi capaz de induzir o estágio de anestesia cirúrgica em parcela representativa da população, assim, não foi possível estabelecer um modelo que representasse de forma adequada a indução à B₃.

Os tempos de manutenção (TM) dos diferentes estágios anestésicos, em função da concentração de benzocaína utilizada, encontram-se na Tabela 55.

TABELA 55 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
60	300	103	10	-	-
80	300	235	244	42	-
100	300	308	296	213	-
120	300	325	296	275	-
140	300	283	296	279	-

Os tempos de manutenção à sedação leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada os valores de TM foram iguais à média, ou seja, a 300 minutos.

Os tempos de manutenção à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, nas dosagens iniciais (T₁ a T₃) e, em seguida, nas concentrações posteriores, tendência à estabilidade.

Os tempos de manutenção à anestesia leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. O ponto de curvatura máxima ocorreu na dosagem de 81,85 mg/L (TM=261minutos), indicando o início da estabilização do tempo de manutenção. Assim, a partir desse ponto TM apresentou valores constantes independente dos tratamentos utilizados.

Assim como no caso anterior, os tempos de manutenção à anestesia profunda também se ajustaram a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. Todavia, neste caso o ponto de curvatura máxima ocorreu na dosagem de 105,80 mg/L (TM=246 minutos). Logo, a partir dessa dosagem aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de manutenção.

Os valores ajustados dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de benzocaína, encontram-se na Tabela 56.

TABELA 56 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), em função da concentração de benzocaína, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	Estado normal	Retorno (minutos)				
		A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
60	29	-	-	-	-	-
80	92	27	11	-	-	-
100	135	81	57	28	8	-
120	155	88	60	33	16	-
140	153	88	60	33	16	-

Os tempos de retorno ao estado normal ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, nas concentrações iniciais (T1 a

T3), com tendência à estabilidade nas últimas, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (T₄ e T₅).

Os demais tempos de retorno (A₁, A₂, B₁ e B₂) ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. Conforme os modelos ajustados pela regressão, os pontos de curvatura máxima, onde TR passa à estabilizar, ocorreram nas dosagens de 97 mg/L (TR=78min, A₁), 96 mg/L (TR=53min, A₂), 100 mg/L (TR= 28min, B₁) e 102 mg/L (TR=14min, B₂). Assim, a partir do tratamento T₃ (100 mg/L), os tempos de retorno à sedação leve, à sedação profunda e à anestesia leve passam a apresentar independência em relação a concentração anestésica. O mesmo pode ser observado em B₂, porém a partir do tratamento T₄ (120 mg/L).

A ausência de diferenças significativas no tempo de recuperação em relação a doses mais altas de benzocaína foi relatada por diversos autores, entre eles, Valente (2009), ao avaliar a utilização de benzocaína, pelo método de aspersão branquial, em reprodutores de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) e de curimbatá (*Prochilodus lineatus*); Oliveira (2009), ao avaliar o uso de diferentes anestésicos (benzocaína, mentol e eugenol) em reprodutores de matrinxã (*Brycon cephalus*), pelo método de imersão; e Inoue (2005), durante a avaliação da resposta de juvenis de matrinxã a três agentes anestésicos (benzocaína, eugenol e fenoxietanol).

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), para esta classe de peso (120g a 160g), a concentração mais adequada para indução à anestesia profunda, ideal para incisões superficiais (microchips subcutâneos), foi a de 100 mg/L de benzocaína, uma vez que, essa dosagem apresentou menor tempo de retorno

(135min) e tempos de indução e manutenção próximos aos obtidos nas dosagens seguintes (120 mg/L e 140 mg/L).

Vale ressaltar que, sob as condições experimentais estabelecidas neste trabalho, a anestesia cirúrgica não foi alcançada por uma parcela representativa da população (60%).

Para o transporte ou para outras atividades em que a sedação profunda seja necessária, as dosagens de 60 mg/L podem ser utilizadas por até 137 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h) ou 103min, com o restabelecimento completo dos animais após um período de recuperação, em água pura (livre de anestésico), de 29 minutos.

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos foram reportados por Takamura *et al.* (2009), ao avaliarem o uso de diferentes concentrações de benzocaína (60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L e 140 mg/L) para sedação e insensibilização de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), com peso médio de 138,49g \pm 15,74g. Os autores concluíram que as cinco concentrações avaliadas foram eficazes somente na sedação dos animais, uma vez que, nenhuma delas foi capaz de insensibilizar uma parcela representativa da população (acima de 60%).

5.3.2. Eugenol

Em todas as classes de peso avaliadas, uma parcela da população amostrada (sempre superior a 40%) apresentaram, em algum momento durante a indução anestésica, reações de vômito e prolapso gástrico.

De acordo com Lafortune *et al.* (2001), o prolapso gástrico é um efeito colateral frequentemente observado durante a indução anestésica por meio do óleo de cravo. Os mesmos autores ao induzirem à anestesia cirúrgica 36 espécimes de *Rana pipiens*, por meio de imersão em 310-318 mg/L de eugenol, por 15 minutos, observaram que 50% dos animais apresentaram prolapso.

Outro efeito colateral frequentemente observado, em todas as classes de peso, foi o aumento de muco. Fato também constatado por Ross *et al.* (2006) em *Xenopus laevis*. Segundo os autores, talvez o eugenol estimule a produção de secreção devido a seu efeito irritante, característico dos fenóis.

5.3.2.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 60 mg/L (T₁), 80 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 120 mg/L (T₄) e 140 mg/L (T₅) de eugenol.

No tratamento T₁, 100% dos animais foram induzidos à sedação leve (A₁) e 60% à sedação profunda (A₂). Possivelmente, os 40% dos indivíduos não sedados se tratassem de animais mais resistentes à ação do fármaco.

A anestesia leve (B₁) foi alcançada por apenas um indivíduo, provavelmente mais sensível a ação do anestésico, e os demais estágios anestésicos, anestesia profunda (B₂) e anestesia cirúrgica (B₃), não foram alcançados, provavelmente, devido à baixa concentração utilizada.

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir na eficácia de um anestésico, resultando em não indução anestésica ou indução de uma

pequena parcela da população. Entretanto, é pouco provável que fatores abióticos como temperatura, pH e salinidade, tenham interferido nos resultados levando a não indução dos animais, uma vez que, todos os animais utilizados em cada um dos tratamentos, foram alocados ao mesmo tempo no interior das respectivas caixas plásticas contendo solução anestésica previamente homogeneizada. Dentre os fatores biológicos que poderiam interferir na ação de um anestésico citam-se variação individual (genética), tamanho ou peso, maturidade sexual, condição corporal (conteúdo de reserva corporal), estado de saúde e estresse (ROUBACH *et al.*, 2002; KING *et al.*, 2005; ROSS e ROSS, 2008).

Goulet *et al.* (2010), ao avaliarem os efeitos da imersão de dois grupos de *X. laevis*, de tamanhos diferentes ($7,5 \text{ g} \pm 2,1 \text{ g}$ e $29,2 \text{ g} \pm 7,4 \text{ g}$), em 350 mg/L de eugenol, constataram a existência de diferenças significativas no tempo de manutenção à anestesia cirúrgica e concluíram que o peso corporal é um importante parâmetro a ser considerado durante a indução anestésica.

Excluindo a variação de peso e tamanho, visto que todos os animais utilizados apresentavam-se na mesma faixa de peso e tamanho, existindo pouca variação entre eles (peso médio= $7,07 \pm 1,24 \text{ g}$; comprimento rostro-cloacal médio= $44,21 \pm 3,27 \text{ mm}$) e a influência da maturidade sexual, uma vez que se trata de imagos recém-metamórficos, ainda longe do início da maturidade sexual, restam apenas a condição corporal, o estado de saúde, o estresse e a variação individual (genética).

Uma vez que todos os animais utilizados foram criados no mesmo local com baixa densidade de estocagem (100 animais/baia), permitindo acesso ao alimento a todos, e sob as mesmas condições de manejo sanitário, profilático e alimentar

(ração com 36% PB, ad libitum), acredita-se que se houve diferenças entre eles, com respeito à condição corporal, estado de saúde e nível de estresse, provavelmente, essas variações são do próprio indivíduo devido à variabilidade fisiológica e não devido a fatores abióticos.

Na dosagem de 80 mg/L (T₂), 100% da população amostral foram induzidas aos dois estágios de sedação (leve e profunda) e 50% à anestesia leve e no tratamento seguinte (100 mg/L), 100% da população amostral foram induzidas à sedação leve, à sedação profunda e à anestesia leve, enquanto que, 50% foram induzidas à anestesia profunda e cirúrgica. Em ambos os casos, supõe-se que a não indução de uma parcela significativa da população aos estágios B₁, B₂ e B₃, tenha ocorrido devido à baixa concentração utilizada, anestesiando apenas aqueles fisiologicamente mais sensíveis ao óleo de cravo (variação individual).

Nos tratamentos seguintes, 120 e 140 mg/L de eugenol, 100% dos indivíduos alcançaram os estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve, e 90% os estágios de anestesia profunda e cirúrgica.

O colapso foi observado apenas em T₅ em que, 40% da população amostral (dois indivíduos) vieram a óbito, justamente aqueles mantidos em solução anestésica por um período de 300 minutos, mesmo após atingirem o estágio de anestesia cirúrgica.

Possivelmente, um fator que pode ter levado os animais a morte é a hipóxia, uma vez que, durante os estágios mais profundos de anestesia a respiração pulmonar é cessada, sendo compensada apenas pela respiração cutânea e, em geral, sem grandes prejuízos a vida do animal (LAFORTUNE, *et al.*, 2001; GENTZ, 2007; MITCHELL, 2009; MITCHELL *et al.*, 2009). Assim, talvez, se durante o

período de indução a solução anestésica tivesse sido aerada, assegurando o teor de saturação de oxigênio, os animais não viessem a óbito.

Segundo King *et al.* (2005), doses elevadas de eugenol são frequentemente associadas ao prolongamento do tempo de recuperação e ao aumento significativo da mortalidade.

Vidal *et al.* (2007b) estimaram a mortalidade de juvenis de piavuçu, em diferentes concentrações de eugenol, após um período de exposição ao anestésicos de 10 minutos. Segundo as estimativas dos autores, para uma mortalidade próxima a 40%, a concentração estimada é de 41 mg/L de óleo de cravo, enquanto que, para 99% de mortalidade a concentração passa para 65 mg/L.

Vidal *et al.* (2008) utilizando a mesma metodologia adotada por Vidal *et al.* (2007b) obtiveram valores bem superiores para juvenis de tilápia-do-nilo. De acordo com os autores a concentração estimada para induzir 99% de mortalidade em tilápias foi de 286,55 mg/L de eugenol. Interpolando os resultados obtidos pelos autores, para uma taxa de mortalidade igual a 40%, a concentração de óleo de cravo necessária seria de 163,32 mg/L.

Os valores ajustados dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 57.

TABELA 57 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
60	22	40	-	-	-
80	20	32	62	-	-
100	20	27	68	76	70
120	20	23	61	96	122
140	20	21	42	99	122

Os tempos de indução à sedação leve ajustaram-se a um modelo raiz quadrada em resposta à variação concentração, com R² de 0,9001. TI apresentou comportamento praticamente constante, não apresentando diferenças significativas ao longo dos tratamentos (0,02min/mg/L de eugenol).

Os tempos de indução à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático decrescente em resposta a variação concentração (0,33min/ mg/L de eugenol), nos tratamentos iniciais (T₁ a T₃) e tendência à estabilidade nas dosagens finais .

Os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo raiz quadrada em resposta à variação concentração. Nas concentrações iniciais, com exceção do tratamento T₁, em que a anestesia não foi alcançada, TI apresentou comportamento praticamente constante, entre T₂ e T₄, e em seguida decrescente (1min/ mg/L de eugenol).

Os tempos de indução à anestesia profunda ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração. Todavia, a partir da dosagem de 100 mg/L, TI tende à estabilidade.

Os tempos de indução à anestesia cirúrgica ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8795. De acordo com o modelo, TI apresentou comportamento crescente nas concentrações iniciais estabilizando nas dosagens mais altas (FIGURA 68). Porém, o valor estimado pela equação de regressão (TI= 70 minutos) subestimou o valor observado no tratamento T_3 , em que o tempo médio de indução foi de 140 minutos. Uma possível explicação para o ocorrido seria a pequena porcentagem de animais induzidos a esse estágio anestésico (50% da população amostral), demonstrando a baixa eficiência dessa dosagem na indução de imagos de rã-touro, pesando entre cinco e dez gramas, à anestesia cirúrgica.

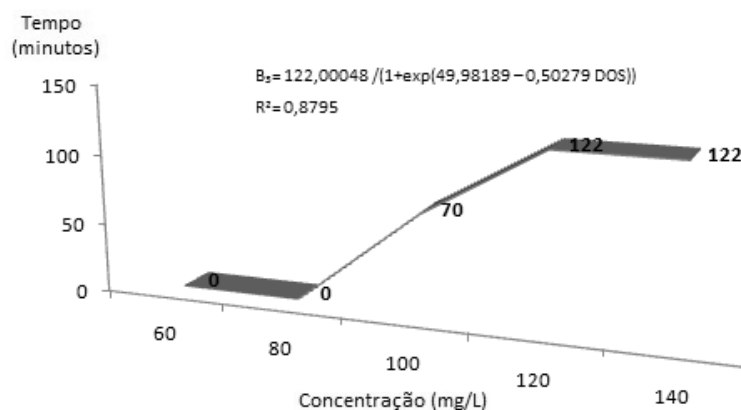


FIGURA 68 – Valores ajustados do tempo de indução à anestesia cirúrgica de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre cinco e dez gramas, induzidos por meio de concentrações crescentes de eugenol.

Assim, se desconsiderarmos o valor estimado pela regressão e adotarmos o tempo médio observado, TI passa a apresentar queda elevada nas concentrações iniciais seguida de estabilização nas dosagens maiores.

Resultados que corroboram com o descrito foram relatados por Inoue *et al.* (2003), para matrinxã (*B. cephalus*), e por Vidal *et al.* (2007a), Vidal *et al.* (2007b) e Vidal *et al.* (2008), para *B. cephalus* e *L. macrocephalus* e *O. niloticus*, respectivamente. Segundo os autores os tempos de indução, nessas espécies, apresentaram queda elevada nas concentrações iniciais e tendência a estabilização nas concentrações maiores.

Com exceção do tempo de indução do estágio de anestesia profunda todos os demais estágios anestésicos apresentaram o mesmo comportamento, redução de TI com o aumento da concentração. Resultados que ratificam o obtido neste trabalho foram reportados para diferentes espécies de peixes, como dourado (*Salminus brasiliensis*), lambari (*Astyanax altiparanae*), jundiá (*Rhamdia quelen*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*), “sea bream” (*Sparus aurata*) e garoupa (*Epinephelus bruneus*) (NEU *et al.*, 2009; HISANO *et al.*, 2008; COPPOLA *et al.* 2008; PARK *et al.*, 2008; CUNHA, 2007; MYLONAS *et al.*, 2005).

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 58.

TABELA 58 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
60	283	139	-	-	-
80	296	241	132	-	-
100	302	285	282	150	150
120	302	297	289	270	270
140	299	299	289	270	270

Embora os tempos de manutenção à sedação (A₁ e A₂) e à anestesia (B₁, B₂ e B₃) tenham se ajustado a diferentes modelos de regressão, estes apresentaram o mesmo padrão comportamental, tendência crescente nas dosagens iniciais e estabilidade nas últimas. Assim, a não influência da concentração anestésica nos tempo de manutenção dos diferentes estágios anestésicos foram observados a partir do tratamento T₂, em A₁ (sedação leve); de T₃, em A₂ (sedação profunda) e B₁ (anestesia leve); e de T₄, em B₂ (anestesia profunda) e B₃ (anestesia cirúrgica).

Os tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol, encontram-se na Tabela 59.

TABELA 59 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Retorno (minutos)					
60	11	-	-	-	-	-
80	79	59	38	12	-	-

100	121	95	67	22	8	7
120	135	110	80	27	13	8
140	129	105	77	26	17	8

Os tempos de retorno ao estado normal, à sedação (leve e profunda) e à anestesia leve ajustaram-se a modelos quadráticos crescentes em resposta à variação da concentração. Todavia, a partir do tratamento T₃ (100 mg/L), tanto os tempos de retorno ao estado normal como também os de retorno à sedação (leve e profunda) e à anestesia leve apresentaram tendência à estabilidade de modo que, aumentos na concentração de eugenol não levaram à alterações expressivas em TR.

Comportamentos semelhantes aos relatados com relação ao tempo de retorno à anestesia foram reportados para reprodutores de pacu (*P. mesopotamicus*) e de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) e para juvenis de piavuçu induzidos à anestesia por meio do óleo de cravo (OLIVEIRA, 2009, VIDAL et al., 2007b).

Os tempos de retorno à anestesia profunda ajustaram-se a um modelo linear crescente, indicando que TR é influenciado positivamente pela aumento da concentração anestésica.

Mylonas *et al.* (2005), no entanto, ao avaliarem a eficácia do óleo de cravo em duas espécies de peixes, o dourado (*Sparus aurata*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), em diferentes temperaturas, relataram comportamento oposto. Segundo os autores, a 25°C, em ambas as espécies, TR apresentou comportamento decrescente.

Os tempos de retorno à anestesia cirúrgica ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração. Todavia, nas concentrações

avaliadas TR apresentou comportamento praticamente constante, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos.

Resultados que corroboram com os obtidos, em que TR apresentou valores constantes independente da dosagem anestésica aplicada, foram reportados para duas espécies de peixes em idade reprodutiva, o piavuçu (*L. macrocephalus*) e o curimatá (*P. lineatus*) (VALENTE, 2009).

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (5g a 10g), a concentração mais adequada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), visando a coleta de amostras teciduais, amputações, instalação de microchips para identificação e rastreamento (subcutâneo) e cirurgias em geral como, por exemplo, laparoscopia, gonadectomia, ovariectomia e endoscopia, foi a de 120 mg/L de óleo de cravo, uma vez que, esta apresentou ausência de mortalidade, menor tempo de indução e tempo de manutenção e retorno próximos aos obtidos na dosagem 140 mg/L.

Todavia, dependendo do objetivo dosagens menores podem ser utilizadas, por exemplo, se o objetivo é facilitar o manejo dos operadores durante a pesagem, mensuração (CRC) e triagem dos animais, em que apenas a sedação leve é necessária, os animais podem ser imersos, por 20 minutos em solução contendo 60 mg/L de eugenol.

Para o transporte dos animais, por até 185 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h), em que é desejável a redução das atividades metabólicas, a sedação profunda pode ser obtida por meio de imersão em 60 mg/L de óleo de cravo, por 40 minutos, com o completo restabelecimentos dos animais

após um período de recuperação (imersão em água livre de anestésico) de 11 minutos.

A anestesia leve pode ser obtida por meio de imersão, por 62 minutos, em 80 mg/L de óleo de cravo, com o completo restabelecimento dos imagos após 79 minutos de imersão em água pura.

Na literatura encontrada com respeito à sedação e anestesia de anuras, as recomendações referem-se, em geral, a apenas duas espécies, *Rana pipiens* e *Xenopus laevis*, ambas aquáticas. Nesses trabalhos os autores recomendam o uso de eugenol em concentrações que variam entre 310 a 350 mg/L para animais adultos (MITCHELL, 2009; GUENETTE, *et al.*, 2007b; LAFORTUNE *et al.*, 2001), valores bem superiores ao recomendado para esta classe de peso. Possivelmente, essas diferenças se devam a variações de existentes, principalmente, entre espécies e peso e/ou idade dos animais avaliados.

Segundo Mitchell (2009), a dose recomendada de óleo de cravo pode variar de acordo com a espécie e o habitat em que o animal vive, uma vez que, em espécies aquáticas requerem dosagens menores de anestésico do que espécies terrestres, 318 a 350 mg/L (*Rana pipiens* e *Xenopus laevis*) versus 450 mg/L (*Ambystoma tigrinum*)

5.3.2.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 75 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 125 mg/L (T₄) e 150 mg/L (T₅) de eugenol.

No tratamento T_1 apenas a sedação leve foi alcançada por 100% da população amostral. Os estágios seguintes, sedação profunda e anestesia leve, foram observados em 40% e 20% da população, respectivamente. Apenas um caso de anestesia profunda e cirúrgica foram constatados. Assim, uma vez que, com exceção da sedação leve, os demais estágios anestésicos não foram alcançados por no mínimo 60% da população e que não houve variação significativa de peso, tamanho e condição corporal (reserva lipídica) entre os animais induzidos à anestesia, supõe-se que os animais que atingiram os estágios anestésicos além da sedação leve fossem indivíduos mais sensíveis ao eugenol ou debilitados.

No tratamento T_2 , 100% dos animais foram induzidos à sedação leve e à sedação profunda e 80% à anestesia leve. Neste caso, ao contrário do relatado anteriormente, provavelmente, os 20% dos indivíduos que não alcançaram o estágio de anestesia leve fossem animais mais resistentes ao composto anestésico. Os demais estágios anestésicos não foram alcançados, provavelmente, devido a baixa concentração utilizada.

Na dosagem de 100 mg/L (T_3), 100% da população amostral atingiram os estágios anestésicos de sedação leve e profunda e anestesia leve e apenas 50% dos animais foram induzidos à anestesia profunda e à anestesia cirúrgica.

No tratamento seguinte, 125 mg/L de eugenol, 100% da população amostral foram induzidas aos estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve. Os estágios de anestesia profunda e cirúrgica foram alcançados, em ambos os casos, por 80% da população amostral.

No tratamento T_5 (150 mg/L), 100% da população amostral alcançaram todos os estágios anestésicos e apenas um indivíduo atingiu o estado de colapso e veio a

óbito. Possivelmente, dois fatores atuando em conjunto tenham levado o animal à morte. O primeiro seria a variação individual, sendo este animal mais sensível à ação anestésico, e o segundo a natureza persistente do óleo de cravo. Devido às características físico-químicas do composto, talvez este tenha se aderido à pele do animal, o que teria dificultado a eliminação do produto durante o período de restabelecimento, aumentando indiretamente o tempo de exposição ao fármaco e aprofundando a anestesia, culminando na morte do animal.

Sladky *et al.* (2001), ao avaliarem a eficácia de óleo de cravo na indução anestésica de pacus, (*Piaractus brachypomus*), relataram que os peixes submetidos à anestesia com eugenol nas concentrações de 100 mg/L e 200 mg/L, apresentaram tempo de recuperação elevado, e que alguns necessitaram ser reanimados. Segundo os autores, a natureza persistente do óleo de cravo, na superfície das brânquias, pode ter aumentando efetivamente o tempo de exposição e, conseqüentemente, prolongado o tempo de recuperação dos animais.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI) aos estágios de sedação leve e profunda e anestesia leve, profunda e cirúrgica, em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 60.

TABELA 60 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte a trinta gramas

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
50	51	-	-	-	-

75	34	32	39	-	-
100	23	30	36	106	116
125	18	28	34	108	116
150	20	26	31	108	116

Os tempos de indução à sedação leve ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9769. TI apresentou comportamento decrescente, com redução acentuada nas concentrações iniciais (0,56min/mg/L de eugenol, entre os tratamentos T_1 a T_3) e, em seguida tendência à estabilização.

Comportamento semelhante foi apresentado por Mylonas *et al.* (2005), ao avaliarem o efeito do óleo de cravo no tempo de indução à anestesia profunda, em duas espécies de peixes (*D. labrax* e *S. aurata*), a diferentes temperaturas (25°C e 15° C). Resultado ratificado pelos achados de Cunha e Rosa (2007) e por Okamoto *et al.* (2009), ao analisarem os efeitos do eugenol no tempo de indução a anestesia em sete espécies de peixes tropicais, e em juvenis do pampo (*T. marginatus*), respectivamente.

Comportamento similar, em que se observa queda acentuada no tempo de indução nas concentrações iniciais mas, com tendência à estabilização nas dosagens finais foram relatados por diversos autores ao avaliarem o tempo de indução a anestesia profunda de juvenis de matrinxã (*B. cephalus*), pintado (*P. corruscans*), piavuçu (*L. macrocephalus*) e tilápia (*O. niloticus*) (INOUE, 2005; VIDAL *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2007a; VIDAL *et al.*, 2007b; VIDAL *et al.*, 2008).

Os tempos de indução à sedação profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelo lineares decrescentes em resposta à variação da concentração, com

reduções de 0,08min a 0,11min para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de óleo de cravo.

Oliveira (2009) e Hisano *et al.* (2008), ao avaliarem o tempo de indução a anestesia em reprodutores de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e em juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) por meio do óleo de cravo, observaram, também, que a eficácia do anestésico aumenta como o aumento da dosagem utilizada, reduzindo o tempo de indução.

Os tempos de indução a anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração e, em ambos os casos, a partir do momento em que a anestesia foi constatada em mais de 50% da população amostral (100 mg/L), TI passa a apresentar comportamento constante, não ocorrendo diferenças significativas no tempo de indução com o aumento da dosagem de eugenol.

Resultados que corroboram com os obtidos, ou seja, TI constante ao longo dos tratamentos, foram reportados para reprodutores de piavuçu (*L. macrocephalus*) e curimatá (*P. lineatus*) induzidos à anestesia profunda e cirúrgica por meio de aspersão branquial de óleo de cravo (VALENTE, 2009).

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 65.

TABELA 65 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte a trinta gramas

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
50	228	-	-	-	-
75	288	255	224	-	-
100	299	295	292	136	136
125	300	300	299	258	258
150	301	300	300	288	288

Os tempos de manutenção à sedação leve e profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração. Nos três casos, os tempos de manutenção apresentaram comportamento linear crescente nas dosagens iniciais (2,40 min/mg/L de eugenol, em A₁; 1,60 min/mg/L de eugenol, em A₂ e 2,72 min/mg/L de eugenol, em B₁), com tendência à estabilização a partir do tratamento T₃. Assim, a partir da dosagem de 100 mg/L de óleo de cravo, aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de manutenção à sedação (leve e profunda) e à anestesia leve.

Os tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se ao mesmo modelo. Modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R² de 0,9695 (FIGURA 69). Assim como observado anteriormente, TM apresentou crescimento linear nas dosagens iniciais (4,88 min/mg/L de eugenol, T₃ a T₄) com tendência à estabilização a partir da dosagem de 125 mg/L.

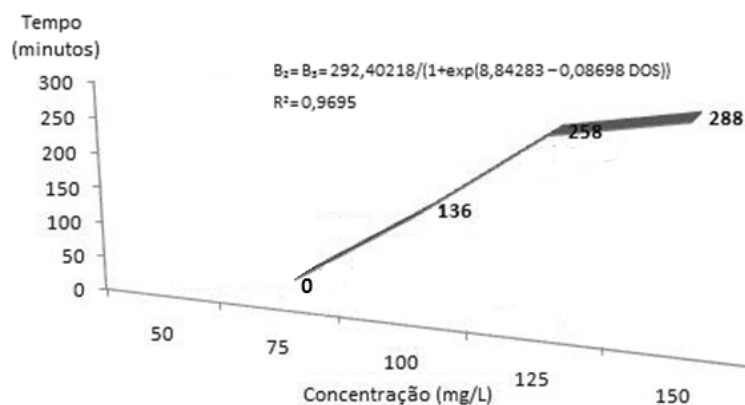


FIGURA 69 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (B_2) e cirúrgica (B_3) em função da concentração de eugenol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte e trinta gramas.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol, encontram-se na Tabela 62.

TABELA 62 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1), à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3), ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre vinte a trinta gramas

Concentração (mg/L)	Estado normal	Retorno (minutos)				
		A_1	A_2	B_1	B_2	B_3
50	13	-	-	-	-	-
75	54	41	41	19	-	-
100	111	92	80	36	21	18
125	183	158	120	52	36	30
150	270	238	159	69	53	41

Nesta classe de peso, os tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve (A_1) e à anestesia profunda (B_2) ajustaram-se a modelos quadráticos crescentes em resposta à variação da concentração, enquanto que, os tempos de retorno à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1) e à anestesia cirúrgica (B_3) ajustaram-se a modelos lineares crescentes.

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (20g a 30g), a dosagem de 100 mg/L de eugenol pode ser utilizada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) uma vez que, essa dosagem apresentou 92% de eficácia na indução a todos os estágios anestésicos, além de menor tempo de retorno e tempos de indução e manutenção próximos aos obtidos na dosagem de 150 mg/L. Todavia, para coleta de amostras teciduais, amputações, instalação de microchips para identificação e rastreamento (subcutâneo) e cirurgias em geral como, por exemplo, laparoscopia, gonadectomia, ovariectomia e endoscopia, em que estágios mais profundos de anestesia são necessários (anestesia cirúrgica), essa dosagem pode não ser a mais adequada devido não só ao longo período de exposição necessário para que os animais alcancem esse estágio anestésico (1h48min) como também em razão do longo período de recuperação (3h). Possivelmente, nessas circunstâncias, o uso de dosagens maiores fosse mais indicado, uma vez que, existem relatos literários relacionando maiores dosagens anestésicas a menores tempos de recuperação, em razão do menor tempo de exposição (GONÇALVES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2001; OSTRENSKY *et al.*, 2000).

Para o manejo comum, do dia a dia, como triagem, pesagem e mensuração dos animais, em que a apenas a sedação leve é necessária, a dosagem de 50 mg/L de eugenol pode ser utilizada, permitindo a manutenção dos animais imersos em

solução anestésica por até 228min e com o restabelecimento do comportamento normal após um período de recuperação de 13 minutos.

A sedação profunda, ideal para o transporte, e a anestesia leve, indicada para incisões superficiais, podem ser obtidas por meio de imersão em 75 mg/L de eugenol por 30 minutos, com o restabelecimento completo dos animais após um período de 54 minutos.

5.3.2.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 75 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 125 mg/L (T₄) e 150 mg/L (T₅) de eugenol.

Nos tratamentos T₁ e T₂, apenas a sedação leve foi alcançada (100% da população amostral), possivelmente, devido à baixa concentração utilizada.

No tratamento T₃, 100% da população amostral atingiram o estágio de sedação leve e 30% a de sedação profunda. Novamente, os demais estágios anestésicos não foram alcançados.

Nos tratamentos seguintes, 125 e 150 mg/L de eugenol, 100% da população amostral alcançaram os estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve. A anestesia profunda em T₄ e em T₅, foram alcançados, respectivamente, por 30% e 60% da população amostral e a anestesia cirúrgica por 10% dos indivíduos,

em ambos os casos. A pequena porcentagem de indivíduos induzidos à anestesia profunda (T_4) e cirúrgica (T_4 e T_5) sugere que esses animais se tratassem de animais mais sensíveis à ação do eugenol.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 63.

TABELA 63 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1), à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3), em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80 a 100 gramas

Concentração (mg/L)	A_1	A_2	B_1	B_2	B_3
	Indução (minutos)				
50	32	-	-	-	-
75	28	60	-	-	-
100	25	60	20	-	-
125	22	44	56	87	120
150	19	30	50	87	100

Os tempos de indução à sedação leve ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9412. TI apresentou comportamento decrescente, indicando que aumentos da concentração de eugenol

levam a reduções no tempo de indução (0,13 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol).

Os demais tempos de indução embora estatisticamente tenham se ajustado a diferentes modelos lineares (sedação profunda e anestesia leve) e não lineares (anestesia profunda e anestesia cirúrgica), com R^2 variando entre 0,7531 a 0,9971, eles não se ajustaram ao observado em laboratório, de modo que o resultado obtido foi bastante diferente do obtido biologicamente. De acordo com os modelos obtidos pela regressão, os tempos de indução aumentam com o aumento da concentração, todavia, em laboratório o observado foi exatamente o oposto, ou seja, aumentos na concentração de eugenol levam a redução de TI. Resultados semelhantes aos observados, em laboratório, foram relatados para diferentes espécies de peixes, como: *Epinephelus bruneus* (garoupa), *Trachinotus marginatus* (pampo), *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata*. (OKAMOTO *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2008; MYLONAS *et al.*, 2005).

Provavelmente, o não ajustamento adequando dos dados tenha sido devido ao pequeno número de animais induzidos aos diferentes estágios anestésicos ao longo da concentração, reduzindo o tempo médio de indução e, conseqüentemente, subestimando os tempos de indução.

Uma vez que até a dosagem de 150 mg/L de óleo de cravo, o anestésico não foi capaz de induzir a anestesia profunda e cirúrgica uma parcela representativa da população, uma sexta dosagem foi testada (175 mg/L). Nessa concentração, 100% da população amostral atingiram todos os estágios anestésicos, porém, 60% da

população vieram a óbito. Segundo King *et al.* (2005), doses mais elevadas de eugenol estão associadas a aumentos na probabilidade do animal vir a óbito.

O eugenol, provavelmente, devido a suas propriedades físico-químicas, tenha se aderido à pele dos animais, devido à alta viscosidade, característica dos óleos, e dificultado a eliminação do anestésico, mesmo após imersão em água pura, devido a sua propriedade altamente hidrofóbica. Além disso, o eugenol, como todo óleo é lipofílico, ou seja, tem grande capacidade de se dissolver em lipídeos e, conseqüentemente, grande difusibilidade pelas barreiras orgânicas, podendo também ter sido absorvido pelo corpo adiposo dos animais, aumentando efetivamente não só a exposição como também a ação do anestésico e levando-os a óbito. Possivelmente, se os animais tivessem sido retirados da solução anestésica logo após alcançarem o estágio de anestesia profunda eles viessem a se restabelecer.

Segundo Sladky *et al.* (2001), em peixes, a natureza persistente do óleo de cravo na superfície das brânquias pode aumentar efetivamente o tempo de exposição ao anestésico e, conseqüentemente, prolongar o tempo de recuperação.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 64.

TABELA 64 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (I₁), à sedação profunda (I₂), à anestesia leve (II₁), à anestesia profunda (II₂) e à anestesia cirúrgica (III), em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g a 100g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
---------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

		Manutenção (minutos)			
50	249	-	-	-	-
75	256	-	-	-	-
100	263	30	-	-	-
125	270	265	256	54	30
150	278	265	256	122	30

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo linear crescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a aumentos na manutenção dos animais sedados, 0,29 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de óleo de cravo.

Os demais ajustaram-se a modelos não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, apresentando crescimento linear nas fase inicial e em seguida tendência à estabilização. Em A_2 , o ponto de curvatura máxima (PCM) estabelecido pela regressão, onde TM passa a apresentar constância, ocorreu na dosagem de 104,58 mg/L. Assim, a partir desse ponto aumentos na concentração anestésica não levam a alterações significativas no tempo de manutenção. Nos demais estágios anestésicos, os PCM ocorreram, respectivamente, nas dosagens de 106,63 mg/L, 127,89 mg/L e 110,73 mg/L de eugenol.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol, encontram-se na Tabela 65.

TABELA 65 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1), à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3) em função da concentração de eugenol, em mg/L, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g a 100g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
50	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
100	27	16	-	-	-	-
125	47	30	13	7	-	-
150	68	45	22	10	-	-

Os tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve e à sedação profunda ajustaram-se a modelos quadráticos em resposta à variação da concentração, com R² de 0,7221, 0,7380 e 0,7650, respectivamente. Nos três modelos obtidos pela regressão, TR apresentou comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a aumentos expressivos nos tempo de retorno, 0,79, 0,53 e 0,28 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol, respectivamente (FIGURA 70).

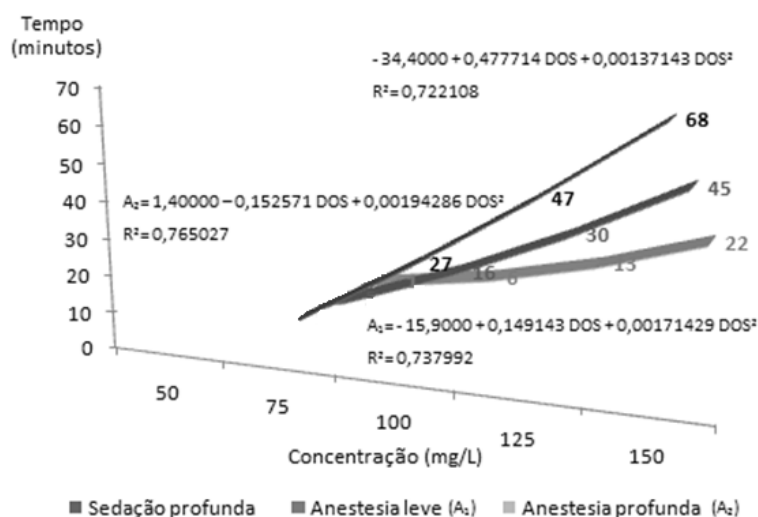


FIGURA 70 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve (A₁) e à sedação profunda (A₂) em função da concentração de eugenol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre oitenta e cem gramas.

Resultado semelhante foi relatado por Silva *et al.* (2009) ao avaliarem o efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. Os autores observaram aumento quadrático do tempo de recuperação com a elevação da concentração.

Os tempos de retorno à anestesia leve ajustaram-se a um modelo linear crescente em resposta à variação da concentração com taxa de crescimento de 0,12 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de óleo de cravo (FIGURA 71).

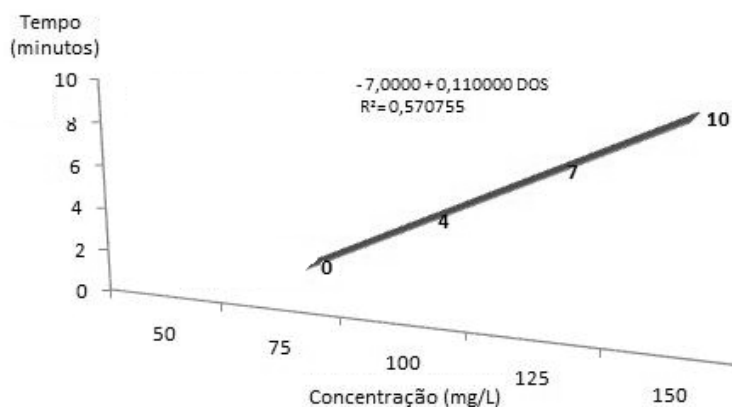


FIGURA 71 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia leve (B_1) em função da concentração de eugenol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre oitenta e cem gramas.

Assim como observado na classe de peso anterior, em todos os estágios anestésicos avaliados os tempos de retorno apresentaram comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração levam a elevação do tempo de retorno. Observações semelhantes com o uso de eugenol foram reportados para juvenis do pampo, de piavuçu, tilápias-do-nilo e garoupas (OKAMOTO et al., 2009; VIDAL et al., 2008; PARK et al., 2008; VIDAL et al., 2007b).

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (80g a 100g), a concentração mais adequada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve e profunda) foi a de 150 mg/L de óleo de cravo uma vez que, essa dosagem apresentou eficácia de 60% na indução à anestesia profunda, após 87 minutos de imersão, com o restabelecimento do comportamento normal dos juvenis após 68 minutos de exposição à água pura. Vale ressaltar que nas condições experimentais realizadas, o estágio de anestesia cirúrgica não foi alcançado, sendo a dosagem recomendada apenas para os estágios A₁ a B₂, e neste último por no máximo 120 minutos.

Na concentração indicada, a ausência total de reflexo de fuga e equilíbrio (anestesia leve), foi observada após 50 minutos de imersão. Trabalhos que divergem dos resultados obtidos foram relatados por Guenette *et al.* (2007), ao avaliarem a eficácia do eugenol para a anestesia em *X. laevis*, pesando entre 90 g a 140 g. De acordo com os autores a ausência total de reflexo de fuga e equilíbrio, em 100% da população, só foi observada após 120 minutos de imersão em solução contendo 350 mg/L de óleo de cravo. Talvez, essa divergência entre dosagens e tempo de indução tenha ocorrido devido a diferenças interespecíficas.

A sedação profunda, ideal para o transporte, por até 353 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h), e a anestesia leve, indicada para incisões superficiais, podem ser obtidas por meio de imersão em 125 mg/L de eugenol por, respectivamente, 44min e 56min, com o restabelecimento dos animais após um período de 47 minutos.

Para o manejo comum, do dia a dia, como triagem, pesagem e mensuração dos animais, em que a apenas a sedação leve é necessária, não só para facilitar o manejo dos operadores como também para evitar possíveis fraturas e, principalmente, reduzir o estresse dos animais, a dosagem de 50 mg/L de eugenol pode ser utilizada, por até 249min, com o restabelecimento do comportamento normal dos juvenis sem a necessidade do período de recuperação (imersão em água pura).

5.3.2.4. Classe de Peso 4 (120g – 160g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 75 mg/L (T₁), 100 mg/L (T₂), 125 mg/L (T₃), 150 mg/L (T₄) e 175 mg/L (T₅) de eugenol.

No tratamento T₁ apenas a sedação leve foi alcançada por 100% da população amostral. Os estágios seguintes, sedação profunda e anestesia leve, foram observados em 40% e 20% da população, respectivamente. Apenas um caso de anestesia profunda e cirúrgica foram constatados.

No tratamento T₂, 100% dos animais foram induzidos à sedação leve e à profunda e 80% à anestesia leve. Neste caso, ao contrário do relatado anteriormente, provavelmente, os 20% dos indivíduos que não alcançaram o estágio de anestesia leve fossem animais mais resistentes ou menos sensíveis ao composto anestésico. Os demais estágios anestésicos não foram alcançados, provavelmente, devido à baixa concentração utilizada.

No tratamento T₃, 100% da população amostral atingiram os estágios anestésicos de sedação leve e profunda e anestesia leve. Nessa concentração, apenas 50% dos animais foram induzidos à anestesia profunda e à anestesia cirúrgica.

No tratamento seguinte, 150 mg/L de eugenol, 100% da população amostral foi induzida aos estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve. Os estágios de anestesia profunda e cirúrgica foram alcançados, em ambos os casos, por 80% da população amostral. Provavelmente, os 20% que não foram induzidos a esses estágios fossem animais menos sensíveis ou mais resistentes à ação do fármaco.

No tratamento T₅ (175 mg/L), 100% da população amostral alcançaram todos os estágios anestésicos. Nessa dosagem, 60% dos animais mantidos em solução anestésica por 300 minutos, mesmo após alcançarem o estágio de anestesia cirúrgica, atingiram o colapso e vieram a óbito.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 66.

TABELA 66 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	indução (minutos)				
75	30	45	50	-	-
100	28	39	52	80	-
125	25	33	47	66	116
150	22	27	38	86	103
175	19	21	25	62	62

Os tempos de indução à sedação leve e à sedação profunda ajustaram-se a modelos lineares decrescente em resposta à variação da concentração, e os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo quadrático decrescente (FIGURA 72). Segundo a regressão, aumentos na concentração de eugenol levam a diminuições no tempo de indução à A₁, à A₂ e à B₁ de 0,11min, 0,24min e 0,25min para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol, respectivamente.

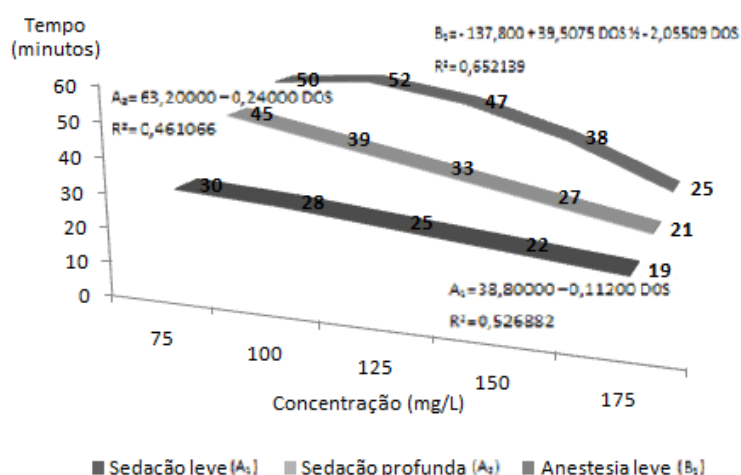


FIGURA 72 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂) e à anestesia leve (B₁) em função da concentração de eugenol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.

Os demais tempos de indução embora estatisticamente tenham se ajustado a modelos quadráticos, com R^2 variando entre 0,8911 e 0,8237, eles não se ajustaram ao observado em laboratório. De acordo com os modelos obtidos pela regressão, os tempos de indução aumentam com o aumento da concentração, porém, em laboratório, o observado foi exatamente o oposto, ou seja, aumentos na concentração de eugenol levam a redução de TI. Provavelmente, o não ajustamento adequando dos dados tenha sido devido ao pequeno número de animais induzidos aos diferentes estágios anestésicos ao longo da concentração, reduzindo o tempo médio de indução e, conseqüentemente, subestimando os valores.

A anestesia profunda foi observada somente a partir da concentração de 100 mg/L de eugenol, em 20% da população amostral, após 80 minutos de exposição ao anestésico. Na concentração seguinte, 100% dos animais foram induzidos a esse estágio após, em média, 66 minutos de imersão. No tratamento T_4 (150 mg/L) apenas 70% dos animais foram induzidos a anestesia profunda após, em média, 85,71 minutos. No tratamento T_5 (175 mg/L), 100% dos animais foram induzidos a anestesia profunda após, em média, 62 minutos de imersão.

Uma vez que, nos tratamentos T_3 e T_5 , 100% dos animais tenham alcançado o estágio de anestesia profunda, provavelmente, os 30% dos animais não induzidos em T_4 fossem, animais mais resistentes a ação do fármaco.

A anestesia cirúrgica foi observada apenas nos três últimos tratamentos após, em média, 116min, 103min e 62min de imersão em 50%, 50% e 80% da população

amostral, respectivamente. Possivelmente, a parcela da população não anestesiada seja composta por animais mais resistentes a ação do anestésico.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol utilizada, encontram-se na Tabela 67.

TABELA 67 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão em função da concentração de eugenol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
75	152	40	21	-	-
100	282	185	146	93	-
125	299	274	260	175	49
150	300	308	276	229	195
175	300	287	277	256	196

Com exceção dos tempos de manutenção à anestesia profunda que apresentaram comportamento crescente ao longo de todos os tratamentos, com aumentos expressivos em TM (2,17 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol) (FIGURA 73), os demais tratamentos apresentaram tendência à estabilização.

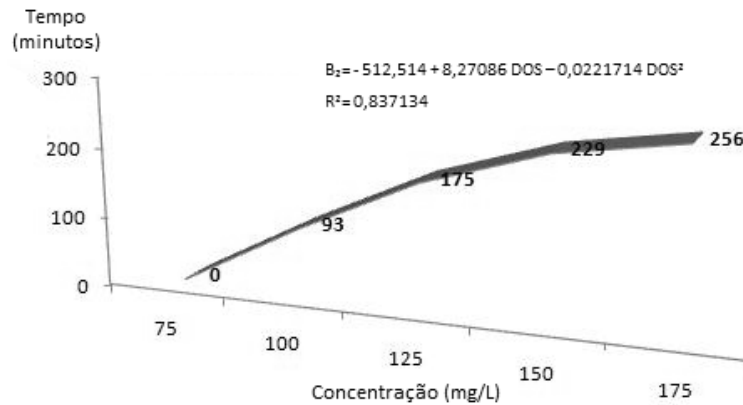


FIGURA 73– Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (B_2) em função da concentração de eugenol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com crescimento linear até a dosagem de 93,22 mg/L (6,20 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol) e, em seguida estabilização. Logo, a partir de do tratamento T_2 , aumentos na concentração de eugenol não levam a alterações significativas no tempo de manutenção.

Os tempos de manutenção à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático crescente até a dosagem de 125 mg/L com tendência a estabilização após esse tratamento.

Os tempos de manutenção à anestesia leve e à anestesia cirúrgica ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração, com ponto de curvatura máxima em 120 mg/L e 130 mg/L, respectivamente, indicando que a partir dessas dosagens o TM começou a estabilizar. Assim, a partir de T_4 não foi observado diferenças significativas no tempo de manutenção à B_1 e à B_2 .

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de eugenol, encontram-se na Tabela 68.

TABELA 68 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), ajustados pela regressão, em função da concentração de eugenol, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
75	-	-	-	-	-	-
100	85	56	41	18	-	-
125	154	105	78	41	20	12
150	189	134	100	64	35	25
175	190	143	106	87	53	42

Em razão da baixa concentração anestésica do tratamento T₁ a manutenção à sedação e à anestesia foram inferiores à 300min. Assim, neste tratamento não foi necessário o período de recuperação (imersão em água livre de anestésico) para o restabelecimento dos animais ao comportamento normal, que neste caso ocorreu em média após 150min.

Os tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve e à sedação profunda ajustaram-se a modelos quadráticos em resposta à variação da concentração, com R² de 0,8832, 0,8409 e 0,7790, respectivamente. Em todos os ajustamentos, TR apresentou comportamento crescente até a dosagem de 150 mg/L, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a aumentos

expressivos no tempo de retorno, 2,08min, 1,56min e 1,18min para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de eugenol, respectivamente, e em seguida tendência à estabilização (FIGURA 74A).

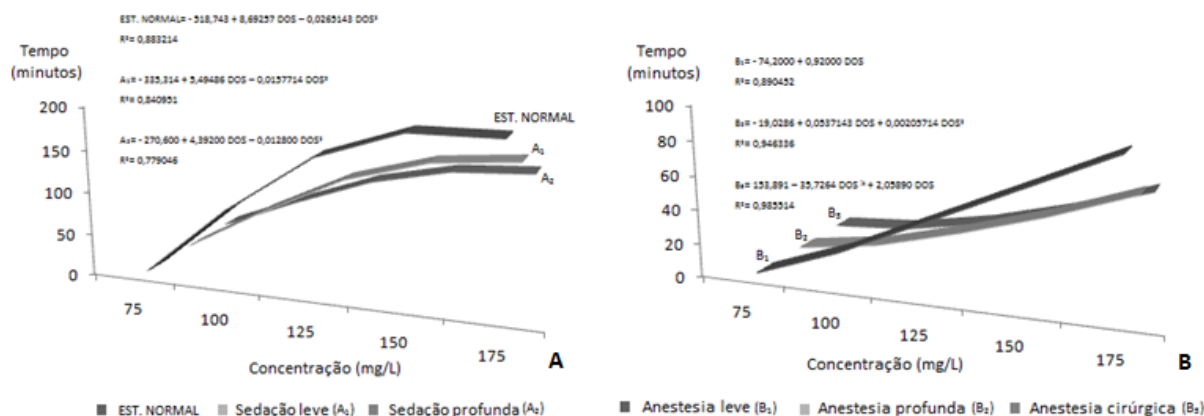


FIGURA 74 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal, à sedação (leve e profunda) (A) e dos tempos de retorno à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) (B) em função da concentração de eugenol, rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.

Os tempos de retorno à anestesia, independente do estágio avaliado (leve, profundo ou cirúrgico), apresentaram padrão crescente ao longo de todos os tratamentos, indicando que aumentos na concentração de eugenol levam a aumentos no tempo retorno (FIGURA 74B).

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), nesta classe de peso (120g a 160g), a concentração mais adequada para indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) foi a de 175 mg/L de óleo de cravo, uma vez que, esta apresentou eficácia de 100% na indução à todos os estágios de anestesia, além de menor tempo de indução e manutenção próximo ao obtido nas dosagens

menores. Todavia, após alcançarem o estágio de anestesia cirúrgica, os animais devem ser removidos da solução a fim de evitar que estes atinjam o estágio de colapso e venham a óbito.

Em manejos em que apenas a sedação leve é suficiente para reduzir o estresse dos animais como, por exemplo, durante manejos rotineiros (triagem, pesagem e mensuração), a dosagem de 75 mg/L pode ser utilizada, por até 152 minutos, com o restabelecimento do comportamento normal das rãs sem a necessidade de período de recuperação (imersão em água pura). Para o transporte, em que a sedação profunda nos parece ser mais apropriada, em razão da redução da atividade metabólica e perda dos reflexos de fuga, a dosagem mais adequada é 100 mg/L, sedando os animais por até 185 minutos ou 246 km (considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h), com o restabelecimento dos animais após 85 minutos de imersão em água pura.

Resultados que corroboram com os obtidos foram relatados por Castro *et al.* (2009), ao avaliarem a eficácia do eugenol para sedação e transporte de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), com peso médio de 137,60g ± 11,26g. Segundo os autores, para fins de sedação e transporte, as dosagens mais indicadas situam-se entre 50 e 75 mg/L de óleo de cravo.

5.3.3. Mentol

5.3.3.1. Classe de Peso 1 (5g – 10g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 60 mg/L (T₁), 70 mg/L (T₂), 80 mg/L (T₃), 90 mg/L (T₄) e 100 mg/L (T₅) de mentol.

No tratamento T₁, a sedação leve e profunda foi alcançada por 100% da população amostral e, o estágio seguinte, anestesia leve, por 20% da população amostral. Os demais estágios anestésicos não foram atingidos, devido provavelmente à baixa concentração anestésica utilizada.

Assim, uma vez que, com exceção da sedação leve e da sedação profunda, os demais estágios anestésicos não foram alcançados por no mínimo 60% da população e que não houve variação significativa de peso, tamanho e condição corporal (reserva lipídica) entre os animais induzidos à anestesia, supõe-se que os animais que atingiram os estágios anestésicos além do estágio A₂ fossem indivíduos mais sensíveis ao mentol ou debilitados, ou seja, animais estressados, exaustos ou enfraquecidos, devido principalmente a variabilidade fisiológica do próprio indivíduo, visto que, todos os animais utilizados foram criados no mesmo local, com baixa densidade de estocagem (100 animais/baia), permitindo a todos livre acesso ao alimento, e sob as mesmas condições de manejo sanitário, profilático e alimentar (ração com 36% PB, *ad libitum*). Assim, acredita-se que se houve diferenças entre os animais, com respeito à condição corporal, estado de saúde e/ou nível de estresse, provavelmente, essas variações são do próprio indivíduo, devido à variabilidade fisiológica intra-específica.

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir na eficácia de um anestésico, resultando em não indução anestésica ou indução de uma pequena parcela da população. Entretanto, é pouco provável que fatores abióticos como temperatura, pH e salinidade, tenham interferido nos resultados levando a não

indução dos animais, uma vez que, todos os animais utilizados em cada um dos tratamentos, foram alocados ao mesmo tempo no interior das respectivas caixas plástica contendo solução anestésica previamente homogeneizada. Dentre os fatores biológicos que podem interferir na ação de um anestésico citam-se variação individual (genética), tamanho ou peso, maturidade sexual, condição corporal (conteúdo de reserva corporal), estado de saúde e estresse (ROUBACH *et al.*, 2002; KING *et al.*, 2005; ROSS e ROSS, 2008).

Excluindo a variação de peso e tamanho, visto que todos os animais utilizados apresentavam-se na mesma faixa de peso e tamanho, existindo pouca variação entre eles (peso médio= $6,74 \pm 1,27$ g; comprimento rostro-cloacal médio= $42,25 \pm 5,28$ mm) e a influência da maturidade sexual, uma vez que, se tratavam de imagos recém-metamórficos, ainda longe do início da maturidade sexual, restam: a condição corporal, o estado de saúde e o estresse, que estariam relacionados à variação individual (genética).

Nos tratamentos T₂ e T₃, todos os estágios de sedação (A₁ e A₂) anestésicos foram alcançados por 100% da população amostral, porém, os estágios seguintes, de anestesia (B₁, B₂ e B₃), foram observadas apenas em uma parcela da população, 70%, 30% e 30%, respectivamente. Possivelmente, a não indução anestésica aos estágios B₂ e B₃ tenha ocorrido devido à baixa concentração de mentol utilizada.

Na dosagem seguinte (90 mg/L), 100% dos animais atingiram os estágios de sedação leve e profunda e os demais estágios (B₁, B₂ e B₃) por 50%, 40% e 40%, respectivamente.

No tratamento T₅, tanto sedação leve quanto a sedação profunda e a anestesia leve foram atingidas por 100% da população amostral, porém, assim como

nas dosagens anteriores os estágios de anestesia profunda e cirúrgica não foram alcançadas por uma parcela representativa da população, provavelmente, devido à baixa dosagem anestésica utilizada.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 69.

TABELA 69 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre cinco a dez gramas

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	indução (minutos)				
60	20	28	50	-	-
70	20	26	49	100	133
80	20	24	51	80	100
90	20	23	48	90	115
100	20	20	20	92	152

Os tempos de indução à sedação leve foram constantes, assim, independente da concentração utilizada o valor de TI foi igual à média, ou seja, de 20 minutos.

Oliveira (2009), ao avaliar o uso do mentol como anestésico em reprodutores de pacu, observou que TI foi constante e independente da concentração utilizada, aproximadamente, 4 minutos.

Os tempos de indução à sedação profunda ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração. TI apresentou comportamento

decrecente, indicando que aumentos na concentração levam a diminuição do tempo de indução, 0,16 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol.

Os demais tempos de indução (anestesia leve, profunda e cirúrgica) embora estatisticamente tenham se ajustado a diferentes modelos (raiz quadrada, quadrática e não linear sigmoidal simples), com R^2 variando entre 0,8138 a 0,8423, esses não se ajustaram ao observado em laboratório, de modo que o resultado obtido estatisticamente foi diferente do obtido biologicamente. De acordo com os modelos obtidos pela regressão, os tempos de indução aumentam com o aumento da concentração. Em laboratório o observado foi exatamente o oposto, ou seja, aumentos na concentração de mentol levam a redução de TI. Provavelmente, o não ajustamento adequando dos dados tenha sido devido ao pequeno número de animais induzidos a esses estágios anestésicos ao longo das concentrações utilizadas e à grande dispersão dos valores observados, em razão da variação individual.

Trabalhos que corroboram com os resultados obtidos foram relatados por Gonçalves *et al.* (2008) ao avaliarem o uso do mentol como substituto da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Segundo os autores, em todos os estágios anestésicos avaliados, aumentos na concentração de mentol também levaram a redução de TI.

O estágio B₁ (anestesia leve) foi alcançado por 20% da população amostral no tratamento T₁. Devido ao número reduzido da população que atingiu esses estado anestésico, supõe-se que essa concentração (60 mg/L de mentol) não seja eficiente para a anestesia de imagos de rã-touro, pesando entre 5 e 10 gramas.

Possivelmente, os 20% da população que alcançaram o estágio de anestesia leve sejam animais mais sensíveis ao fármaco ou debilitados (animais enfraquecidos ou estressados). Nos tratamentos T₂ e T₃, 70% da população alcançaram o estágio de anestesia leve, em ambos os casos. Mas no tratamento seguinte (90 mg/L de mentol), apenas 50% da população foi induzida ao estágio B₁. Assim, acredita-se que tanto o tratamento T₂ quanto os tratamentos T₃ e T₄ têm baixa eficiência na anestesia leve de imagos de rã-touro, pesando entre 5g a 10g, anestesiando em média 50% da população. No tratamento T₅, 100% dos animais foram induzidos à anestesia leve, após 20 minutos de imersão.

O estágio B₂ (anestesia profunda) não foi alcançado no tratamento T₁, indicando a necessidade de dosagens maiores para a indução à anestesia profunda. Nos tratamentos T₂ e T₃, 30% da população amostral atingiram o estágio de anestesia profunda e nos tratamentos T₄ e T₅, 40% e 50% da população alcançaram o estágio B₂, respectivamente.

O estágio B₃ (anestesia cirúrgica) foi observado apenas a partir da dosagem de 70 mg/L, em 30%, 30% 40% e 50% da população amostral, em T₂, T₃, T₄ e T₅, respectivamente.

Assim, devido ao número reduzido da população amostral que atingiu os estágios anestésicos B₂ (30%) e B₃ (30%), presumi-se que as concentrações utilizadas não foram eficientes para a indução à anestesia cirúrgica de imagos de rã-touro, pesando entre 5g e 10g.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 70.

TABELA 70 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 5g a 10g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
60	287	108	59	-	-
70	293	190	94	89	89
80	296	244	129	120	120
90	298	270	164	121	121
100	298	268	200	121	121

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. TM apresentou comportamento linear crescente até a dosagem de 80 mg/L (0.60min/mg/L de mentol) e, em seguida estabilização.

Os tempos de manutenção à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático crescente em resposta à variação da concentração, apresentando aumentos expressivos nos tratamento iniciais (5,40min/mg/L de mentol) e tendência à estabilização a partir de T₄. Logo, entre os tratamentos T₄ e T₅ não houve diferenças significativas quanto ao tempo de manutenção à sedação profunda.

Os tempos de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica ajustaram-se ao mesmo modelo. Modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, apresentando crescimento linear até o ponto de curvatura máxima (71,25 mg/L, TM=100min), e após esse ponto estabilização.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada encontram-se na Tabela 71.

TABELA 71 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre cinco a dez gramas

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
60	18	9	-	-	-	-
70	40	29	18	-	-	-
80	54	41	27	14	7	4
90	61	45	30	13	7	4
100	61	42	27	14	5	3

Nesta classe de peso, os tempos de retorno ao estado normal e à sedação (leve e profunda) apresentaram aumentos expressivos até a dosagem de 80 mg/L (2,20 minutos, 1,60 minutos e 0,90 minutos, respectivamente, para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) e, em seguida, estabilização.

Os tempos de retorno à anestesia leve, profunda e cirúrgica também apresentaram valores praticamente constantes, sem diferenças significativas entre os tratamentos.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, para esta classe de peso (5g a 10g), a concentração adequada para indução à anestesia (profunda e cirúrgica), adequadas para incisões superficiais (marcação por microchips subcutâneos) e

intervenções cirúrgicas (coleta de tecidos, amputação, gonadectomia e ovariectomia), não foi determinada, uma vez que, esses estágios não foram alcançados por uma parcela representativa da população (acima de 60%). Além disso, os longos períodos de indução observados em todos os tratamentos inviabilizam a recomendação de qualquer um dos tratamentos avaliados para esses fins.

Todavia, para o manejo diário (triagem, pesagem e mensuração), a dosagem de 60 mg/L apresentou resultados satisfatórios, induzindo aos animais a sedação leve em um intervalo de tempo reduzido (20 minutos) e permitindo a manutenção dos mesmos, sedados e em solução, por até 287min, com o restabelecimento do comportamento normal após 18 minutos de imersão em água livre de anestésico.

Para o transporte ou para outras atividades em que a sedação profunda seja necessária, as dosagens de 60, 70 e 80 mg/L podem ser utilizadas por até 144 km, 258 km e 360 km, considerando a velocidade média do veículo de 80 km/h, com o restabelecimento completo dos animais após um período de recuperação em água pura (livre de anestésico) de 18min, 40min e 54min, respectivamente.

Para a marcação dos animais que, em geral, é realizada por meio de amputação de dedos e artelhos (MARTOF, 1953), a prévia anestesia leve, visando a redução da dor, pode ser realizada por meio da dosagem de 100 mg/L, onde os animais alcançam o estágio desejado em 20min, podendo ser mantidos anestesiados e em solução anestésica, sem prejuízos aparentes, por até 158min, com o restabelecimento do comportamento normal após 60min de imersão em água livre de anestésico.

5.3.3.2. Classe de Peso 2 (20g – 30g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 75 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 125 mg/L (T₄) e 150 mg/L (T₅) de mentol.

No tratamento T₁ apenas a sedação leve foi alcançada por 100% da população amostral. O estágio seguinte (sedação profunda) foi observado em 60% da população, uma parcela representativa da população. Os demais estágios anestésicos não foram alcançados. Assim, em imagos de rã-touro, pesando entre 20g a 30g, essa dosagem de mentol é eficaz apenas para a indução à sedação leve e à sedação profunda.

O tratamento T₂ (75 mg/L de mentol) foi eficaz não só na indução à sedação (leve e profunda) como também na indução à anestesia leve, anestesiando 100% da população amostral.

Os demais tratamentos (100, 125 e 150 mg/L de mentol) foram eficientes na indução de todos os estágios anestésicos (sedação leve, sedação profunda, anestesia leve, anestesia profunda e anestesia cirúrgica), induzindo 100% da população tanto à sedação quanto à anestesia. Todavia, no tratamento T₅ (150 mg/L de mentol) 20% da população amostral, mantida em solução anestésica por 300 minutos (dois animais), vieram a óbito, após terem atingindo o estágio definido como colapso.

Uma vez que a literatura referente ao uso de mentol visando à indução anestésica em vertebrados é escassa e é, ainda, desconhecida os mecanismos fisiológicos envolvidos na ação do mentol, possivelmente a mortalidade dos imagos pode estar associada à exposição demasiadamente longa ou ao anestésico.

Outro fator que pode ter levado os animais a morte é a hipóxia, uma vez que, durante os estágios mais profundos de anestesia (anestesia cirúrgica) a respiração pulmonar é cessada, sendo compensada apenas pela respiração cutânea, embora, em anfíbios, a apneia seja freqüentemente observada, em geral, sem grandes prejuízos a vida do animal (LAFORTUNE, *et al.*, 2001; GENTZ, 2007; MITCHELL, 2009; MITCHELL *et al.*, 2009). Talvez, se durante o período de indução a solução anestésica tivesse sido aerada, assegurando o teor de saturação de oxigênio, os animais não viessem a óbito.

Uma terceira hipótese seria lise celular em razão de alterações iônicas resultantes do uso do mentol. Diversos trabalhos têm demonstrado a existência de interação negativa entre o uso de anestésicos e parâmetros sanguíneos e hematológicos como, por exemplo, cortisol circulante, glicose plasmática, número de eritrócitos e taxa de hemoglobina, os quais são indicativos de estresse agudo (GOMES *et al.*, 2001; BOLASINA, 2006). Sartore *et al.* (2007), ao avaliarem o uso de mentol no transporte de alevinos de piaçu (*Leporinus macrocephalus*), constataram que a imersão dos peixes em 8 mg/L de mentol implicou em morte rápida dos animais. A hipótese formulada pelos autores, para explicar a alta mortalidade encontrada, foi de lise celular resultante do aumento intracelular do íon potássio (K⁺).

Façanha e Gomes (2005), ao avaliarem a eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), verificaram aumentos significativos do íon potássio no plasma dos peixes exposto a concentrações superiores a 50 mg/L e associaram esses aumentos ao rompimento das células dos animais anestesiados por meio de mentol.

Mortalidades superiores aos encontrados foram reportadas por Simões e Gomes (2009). De acordo com os autores, a exposição de juvenis de tilápia-do-nilo em 250 mg/L de mentol, por um período de 20min e 30min, induziu a óbito 20% e 10% da população amostral, respectivamente, e concluíram que a margem de segurança do mentol para uma exposição prolongada é baixa. Todavia, em todas as concentrações avaliadas, os imagos de rã-touro foram expostos por um período 15 a 10 vezes maior do que o relatado por Simões e Gomes (2009), obtendo-se baixa mortalidade (4%, no máximo) de forma que, aparentemente, a margem de segurança do mentol para rã-touro é superior ao observado para peixes.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 72.

TABELA 72 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃), em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g a 30g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	indução (minutos)				
50	20	27	-	-	-
75	20	25	35	-	-
100	20	23	43	49	84
125	20	21	35	49	84
150	20	20	20	49	84

O tempo de indução à sedação leve foi constante, assim, independente da concentração utilizada o valor de TI foi igual à média, ou seja, de 20 minutos.

Os tempos de indução à sedação profunda ajustaram-se a um modelo linear decrescente em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração de mentol levam a redução do tempo de indução (0,072 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol).

Os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo raiz quadrada em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7801. TI apresentou comportamento inicial crescente, até a concentração de 100 mg/L, indicando que aumentos na concentração levam a aumentos no tempo de indução à B_1 e, em seguida decrescente. Na fase inicial, a taxa de aumento foi de 0,32 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol enquanto que, na fase seguinte (decrescente), a taxa de redução foi de 0,46 minutos (FIGURA 75).

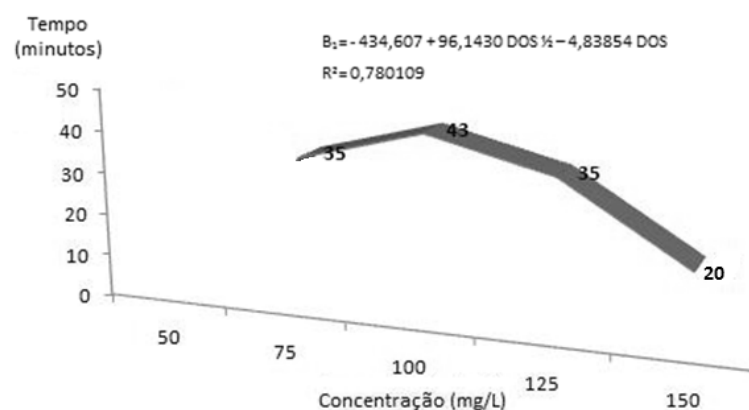


FIGURA 75 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à anestesia leve (B_1) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g e 30g.

Os tempos de indução à anestesia profunda e à anestesia cirúrgica não apresentaram diferenças significativas a partir da dosagem de 100mg/L, apresentado valores constantes ao longo dos tratamentos avaliados.

Resultados semelhantes foram reportados para reprodutores de curimatá (*P. lineatus*) por Valente (2009).

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 73.

TABELA 73 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g a 30g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
50	152	52	-	-	-
75	300	181	157	-	-
100	300	266	253	292	282
125	300	306	299	300	300
150	300	303	310	300	300

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração. TM apresentou comportamento crescente até a dosagem de 51,54 mg/L (TM= 264,24 minutos) e, em seguida, estabilização.

Os tempos de manutenção à sedação profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos quadráticos em resposta à variação da concentração. Em ambos os casos, TM apresentou comportamento crescente até a dosagem de 125 mg/L, indicando que aumentos na concentração de mentol levam a aumentos no tempo de manutenção (3,38min/mg/L de mentol e 2,84 min/mg/L de mentol, respectivamente) e, em seguida, tendência a estabilização (FIGURA 76).

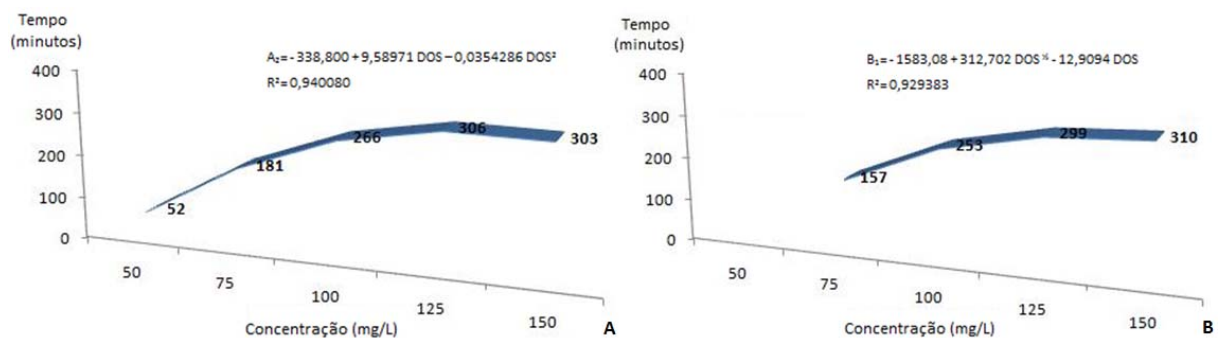


FIGURA 76 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação profunda (A) e à anestesia leve (B) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g e 30g.

Os tempos de manutenção à anestesia profunda e à anestesia cirúrgica ajustaram-se a modelos não lineares sigmoidais simples em resposta à variação da concentração (FIGURA 77).

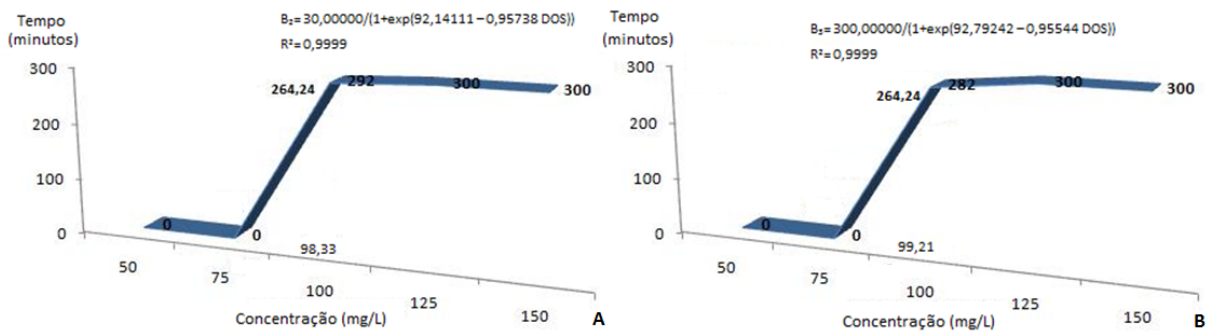


FIGURA 77 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à anestesia profunda (A) e cirúrgica (B) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g e 30g.

De acordo com estes modelos, os pontos de curvatura máxima de B_2 e B_3 ocorreram nas dosagens de 98,33 mg/L e 99,21 mg/L, respectivamente, indicando o início da estabilização do tempo de manutenção. Logo, para as variáveis: tempo de manutenção à anestesia profunda e tempo de manutenção à anestesia cirúrgica não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos T_3 a T_5 .

Os tempos de retorno em geral, com exceção dos dois últimos estágios anestésicos, apresentaram o mesmo comportamento, redução com o aumento da concentração anestésica.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol, encontram-se na Tabela 74.

TABELA 74 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A_1), à sedação profunda (A_2), à anestesia leve (B_1), à anestesia profunda (B_2) e à anestesia cirúrgica (B_3) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g a 30g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃	
		Retorno (minutos)					
50	-	-	-	-	-	-	
75	61	43	22	14	-	-	
100	109	78	43	28	21	14	
125	125	92	64	42	24	15	
150	111	85	85	56	20	11	

Os tempos de retorno ao estado normal e à sedação leve ajustaram-se a modelos quadráticos em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8325 e 0,8141, respectivamente. TR, em ambos os casos, apresentou comportamento inicial crescente, até a concentração de 125 mg/L, indicando que aumentos na concentração de mentol levam a aumentos no tempo de retorno (1,28min e 0,98min para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol, respectivamente) e, em seguida, decrescente (0,56min/mg/L de mentol, $TR_{\text{estado normal}}$ e 0,52min/mg/L. TR_{A1}).

Os tempos de retorno à sedação profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos lineares crescentes em resposta à variação da concentração, com aumentos de 0,85 minutos e 0,55 minutos, respectivamente, para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol.

Embora os tempos de retorno à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) ajustaram-se a modelos quadráticos em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,6296 e 0,6120, respectivamente, nas concentrações avaliadas, TR em ambos os casos apresentou variações pequenas ao longo dos tratamentos (0,02min/mg/L de mentol, em B₂ e 0,06min/mg/L de mentol, em B₃) apresentando comportamento praticamente constante (FIGURA 78).

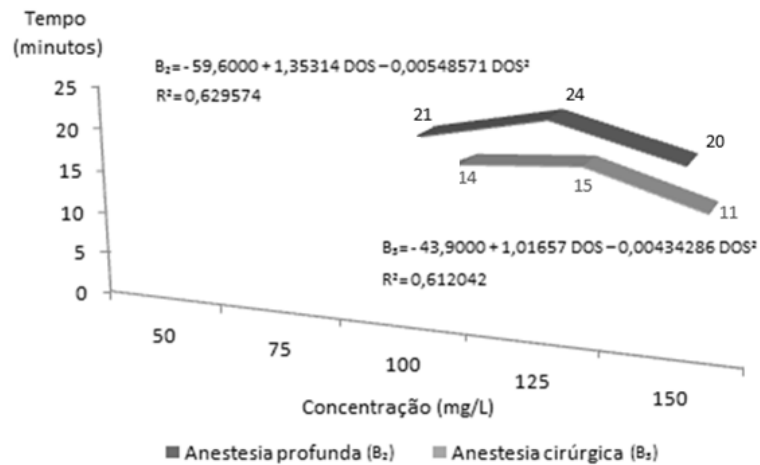


FIGURA 78 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 20g e 30g.

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), para esta classe de peso (20g a 30g), a concentração mais adequada para indução à todos os estágios de sedação (leve e profunda) e anestesia (leve, profunda e cirúrgica) foi a de 100 mg/L de mentol, uma vez que, essa dosagem apresentou menores tempos de indução e de manutenção próximos aos obtidos nas dosagens maiores e menores tempos de retorno em cada um dos estágios anestésicos.

Para o manejo diário (triagem, pesagem e mensuração), em que apenas a sedação leve é necessária, a dosagem de 50 mg/L é a mais indicada, sedando os animais por até 2h30min, com o restabelecimento dos imagos sem a necessidade do manejo de recuperação (imersão em água livre de anestésico).

Para o transporte dos animais a curtas distâncias, até 69 Km (considerando a velocidade média de 80 Km/h), em que apenas a sedação profunda dos animais é necessária, visando à redução das atividades metabólicas, a dosagem de 50 mg/L

pode, também, ser utilizada, porém, para trajetos mais longos, de até 240 km (velocidade média de 80 km/h), a dosagem mais adequada é a de 75 mg/L, a mesma indicada para a anestesia leve por até 2h36min.

5.3.3.3. Classe de Peso 3 (80g – 100g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 50 mg/L (T₁), 75 mg/L (T₂), 100 mg/L (T₃), 125 mg/L (T₄) e 150 mg/L (T₅) de mentol.

No tratamento T₁, 100% dos animais alcançaram o estágio de sedação leve, caracterizado pela redução do reflexo de fuga e perda parcial do equilíbrio. Todavia, os demais estágios anestésicos (sedação profunda, anestesia leve, anestesia profunda e anestesia cirúrgica) não foram alcançados devido à baixa concentração anestésica utilizada.

No tratamento T₂, 100% dos animais atingiram o estado de sedação leve, 30% a de sedação profunda e 10% a de anestesia leve. Porém, devido ao número reduzido de animais que alcançaram os estágios A₂ e B₁, supõe-se que estes fossem mais sensíveis à ação do mentol.

Nas dosagens seguintes (100, 125 e 150 mg/L de mentol), 100% da população amostral alcançaram os estágios de sedação (leve e profunda) e de anestesia leve. A anestesia profunda e cirúrgica, em T₃ e T₄, não foram alcançadas por uma parcela representativa da população, sendo observadas, respectivamente, em 30% e 10% dos indivíduos, no tratamento T₃, e em 50% e 20% dos animais em T₄.

No tratamento T₅ (150 mg/L de mentol), 70% da população amostral foram induzidas aos estágios de anestesia profunda e cirúrgica. Uma vez que uma parcela representativa da população atingiu os estágios B₂ e B₃, provavelmente, os 30% dos animais que não foram anestesiados fossem mais resistentes à ação do fármaco.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação leve e os tempos médios de indução à sedação profunda e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 75.

TABELA 75 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de juvenis rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g a 100g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
50	36	-	-	-	-
75	29	70	80	-	-
100	23	44	62	95	140
125	21	27	55	92	140
150	21	28	56	74	91

Os tempos de indução à sedação leve, entretanto, ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R² de 0,7757. TI apresentou comportamento decrescente, até a dosagem de 100 mg/L, indicando que

aumentos na concentração levam à reduções no tempo de indução (0,26 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol) e, em seguida, estabilização (FIGURA 79).

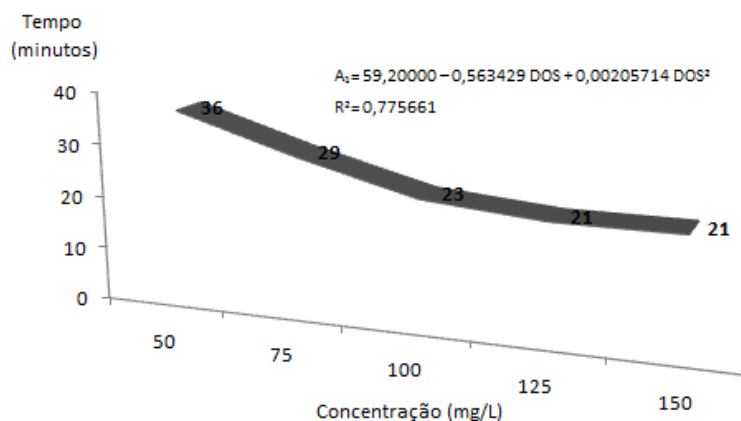


FIGURA 79 - Valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação leve (A_1) em função da concentração de mentol, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g e 100g.

Nesta classe de peso, os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação profunda e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) não se adequaram aos obtidos em laboratório, apresentando padrões opostos aos observados. De acordo com os modelos ajustados pela regressão, os tempos de indução, em função da concentração de mentol, apresentaram comportamento crescente, ou seja, TI aumentava com o aumento da dosagem anestésica. Todavia, em todos os estágios anestésicos avaliados, TI apresentou correlação negativa com a dosagem de mentol, reduzindo ao longo dos tratamentos.

O não ajustamento adequado dos dados pode ter ocorrido em função do pequeno número de indivíduos que alcançaram esses estágios anestésicos, principalmente, nos tratamentos iniciais, e a grande variação à resposta anestésica desses indivíduos. Assim, para esta classe de peso e para os estágios anestésicos

A₂, B₁, B₂ e B₃, optou-se pela utilização dos valores médios de TI ao invés dos valores ajustados.

Trabalhos que corroboram com os resultados então obtidos foram relatados por Oliveira (2009), ao avaliar o tempo de indução à anestesia profunda em reprodutores de matrinxã (*B. cephalus*), por meio de mentol e benzocaína. De acordo com o autor, em ambos os casos, TI apresentou comportamento decrescente, indicando que aumentos na concentração dos anestésicos levam a redução do tempo de indução.

Todavia, Valente (2009) relatou a não existência de diferenças estatísticas quanto ao tempo de indução em reprodutores de curimatá, expostos a diferentes concentrações de mentol.

Conforme o exposto para a indução, os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção e de retorno à sedação profunda e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica) não se adequaram aos obtidos em laboratório, adotando-se dessa forma os valores médios obtidos em cada tratamento.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação leve e os tempos médios de manutenção à sedação profunda e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 76.

TABELA 76 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g a 100g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
50	282	-	-	-	-
75	300	247	300	-	-
100	300	240	238	260	300
125	300	269	256	270	300
150	300	300	286	300	300

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 46,42 mg/L (TM= 35,76 minutos), indicando o início de aumentos expressivos no tempo de manutenção, e o ponto de curvatura máxima em 49,43 mg/L (TM= 264,24 minutos), indicando que a partir dessa dosagem TM começou a estabilizar (FIGURA 80). Assim, nas dosagens utilizadas (50 mg/L a 150 mg/L de mentol) não houve diferenças significativas no tempo de manutenção com o aumento da concentração.

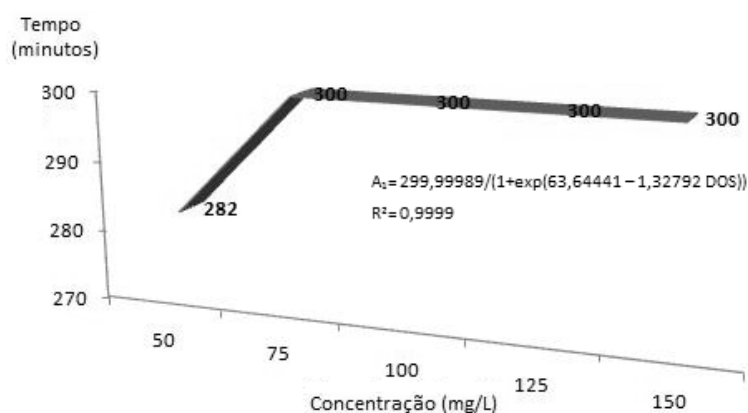


FIGURA 80 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação leve (A_1) em função da concentração de mentol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g e 100g.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação leve e os tempos médios de retorno à sedação profunda e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol, encontram-se na Tabela 77.

TABELA 77 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (I₁), à sedação profunda (I₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de imagos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g a 100g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
50	30	15	-	-	-	-
75	62	21	40	-	-	-
100	89	58	36	30	15	13
125	112	74	52	40	50	30
150	130	120	106	73	65	50

Os tempos de retorno ao estado normal ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,8900. TR apresentou comportamento crescente, indicando que aumentos na concentração levam a aumentos no tempo de retorno, 0,10 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol (FIGURA 81).

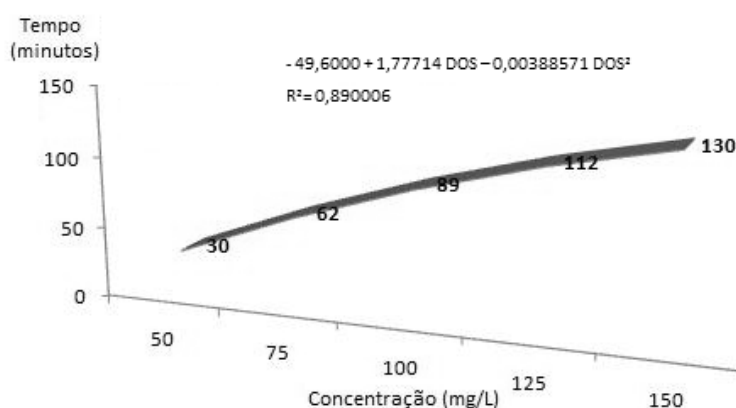


FIGURA 81 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal em função da concentração de mentol, de juvenis de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 80g e 100g.

Com base nos resultados obtidos (TI, TM e TR), para esta classe de peso (80g a 100g), a concentração mais adequada para indução a todos os estágios de sedação (leve e profunda) e anestesia (leve, profunda e cirúrgica) é a de 150 mg/L de mentol, induzindo à sedação e à anestesia 100% e 70% da população amostral, respectivamente, após 20min de imersão com o restabelecimento completo dos animais após 130 minutos de imersão em água livre de anestésico.

Para sedação leve, condição adequada para acalmar os animais, evitando possíveis traumatismos, e facilitar o trabalho dos operadores durante a realização de manejos rotineiros como triagem, pesagem e mensuração, a dosagem de 50 mg/L pode ser utilizada de maneira efetiva, sedando os animais por até 4h42min, com o

restabelecimento do comportamento normal das rãs após 30min de imersão em água pura (livre de mentol).

Para fins de transporte dos animais, por até 281 Km (considerando a velocidade média de 80 Km/h), em que apenas a sedação é necessária, visando à redução das atividades metabólicas, a dosagem de 100 mg/L pode ser utilizada, todavia, durante o período de recuperação (89min) é necessário que as rãs sejam alocadas em baias com pouca água para evitar o possível afogamento dos animais uma vez que, estes podem estar sem equilíbrio devido ao aprofundamento da anestesia até o estágio B₁ (anestesia leve).

5.3.3.4. Classe de Peso 4 (120g – 160g)

Nesta classe de peso as concentrações utilizadas foram de 75 mg/L (T₁), 100 mg/L (T₂), 125 mg/L (T₃), 150 mg/L (T₄) e 175 mg/L (T₅) de mentol.

Tanto o tratamento T₁ quanto o tratamento T₂ foram eficazes apenas para a sedação leve dos animais, induzindo 100% da população amostral a esse estágio anestésico. Os demais estágios (sedação profunda, anestesia leve, anestesia profunda e anestesia cirúrgica) não foram alcançados, devido às baixas dosagens utilizadas.

No tratamento T₃, 100% dos animais foram induzidos aos estágios de sedação leve e sedação profunda, porém, os estágios de anestesia (B₁, B₂ e B₃) não foram alcançados, devido à baixa concentração utilizada.

Nos tratamentos seguintes, 150 e 175 mg/L de mentol, 100% da população amostral foi induzida aos estágios de sedação leve, sedação profunda e anestesia leve, enquanto que a anestesia profunda e cirúrgica foram alcançados, em ambos os casos, por uma parcela não significativa da população amostral, em média, 20% (dois animais) e 10% (um animal), respectivamente, indicando a baixa eficiência dessas dosagens na indução de jovens-adultos de rã-touro aos estágios anestésicos B₂ e B₃.

Uma vez que, nesta classe de peso os estágios de anestesia profunda e cirúrgica não foram alcançados, uma sexta dosagem, contendo 200 mg/L de mentol, foi avaliada. Nessa concentração, 100% da população amostral foram induzidas tanto à sedação (leve e profunda) quanto à anestesia (leve, profunda e cirúrgica). Porém, o aumento de 25 mg/L de mentol resultou no aumento da mortalidade para níveis não recomendáveis (acima de 50%), sendo desta forma descartada.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de indução à sedação (leve e profunda) e à anestesia (leve, profunda e cirúrgica), em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 78.

TABELA 78 – Tempos de indução (TI), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Indução (minutos)				
75	41	-	-	-	-
100	36	-	-	-	-
125	31	51	-	-	-
150	26	56	82	130	160
175	21	41	138	150	160

Os tempos de indução à sedação leve ajustaram-se a um modelo linear em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,7508. TI apresentou comportamento decrescente, indicando que aumentos na concentração levam a redução do tempo de indução (0,20 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol).

Os tempos de indução à sedação profunda ajustaram-se a um modelo quadrático em resposta à variação da concentração, com comportamento inicial tendendo à estabilidade, não apresentando diferenças significativas quanto ao tempo de indução (T_3 e T_4) e, em seguida, decrescente.

Os tempos de indução à anestesia leve ajustaram-se a um modelo não linear sigmoidal simples em resposta à variação da concentração, com R^2 de 0,9999. O ponto de curvatura mínima ocorreu na dosagem de 142,91 mg/L, indicando o início de aumentos expressivos no tempo de indução, e o ponto de curvatura máxima em 154,82 mg/L, indicando que a partir dessa dosagem TI começou a estabilizar.

Em razão do pequeno número de animais induzidos aos estágios de anestesia profunda (dois animais) e anestesia cirúrgica (um animal), os valores estimados pelos modelos de regressão foram inferiores aos observados em laboratório, subestimando-os. Assim, optou-se pela adoção dos valores médios observados em cada tratamento. Visto que, estes valores não são representativos, uma vez que, não foram observados em uma parcela significativa da população amostral, eles não foram utilizados como base para recomendação.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção (TM) à sedação leve, sedação profunda e anestesia leve e os tempos médios de manutenção à anestesia profunda e cirúrgica, em função da concentração de mentol utilizada, encontram-se na Tabela 79.

TABELA 79 – Tempos de manutenção (TM), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
	Manutenção (minutos)				
75	233	-	-	-	-
100	253	-	-	-	-
125	272	250	-	-	-
150	292	262	264	300	300
175	312	297	294	300	300

Os tempos de manutenção à sedação leve ajustaram-se a um modelo linear crescente em resposta à variação da concentração, com aumentos de 0,79 minutos para cada acréscimo na concentração de 1 mg/L de mentol.

Os tempos de manutenção à sedação profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos não linear sigmoidais simples em resposta à variação da concentração, segundo os quais os pontos de curvatura máxima, que indicam o momento em que TM passa a ser constante e conseqüentemente independente da concentração, ocorreram na concentração de 125,82 mg/L e 149,78 mg/L, respectivamente. (FIGURA 82).

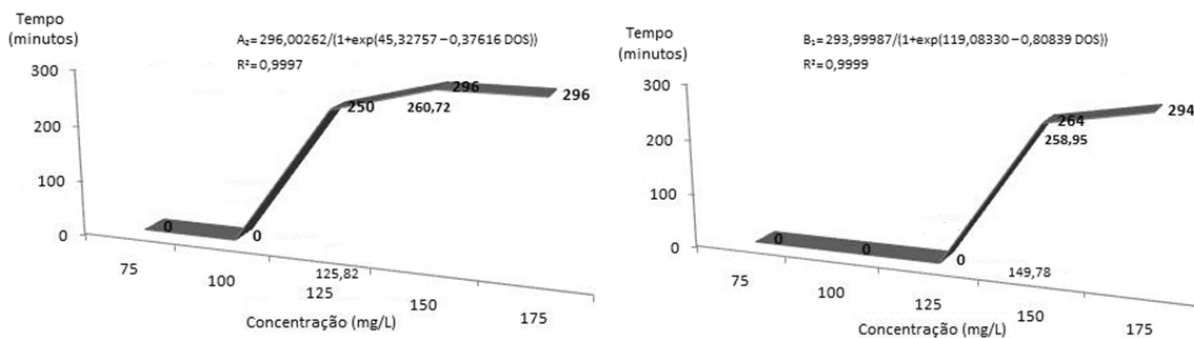


FIGURA 82 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de manutenção à sedação profunda (A₂) e à anestesia leve (B₁) em função da concentração de mentol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.

Os valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno (TR) à sedação leve, à sedação profunda e à anestesia leve e os tempos médios de retorno à anestesia profunda e cirúrgica, em função da concentração de mentol, encontram-se na Tabela 80.

TABELA 80 – Tempos de retorno (TR), em minutos, à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) em função da concentração de mentol, em mg/L, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g a 160g

Concentração (mg/L)	Estado normal	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
		Retorno (minutos)				
75	30	14	-	-	-	-
100	33	17	-	-	-	-

125	40	23	-	-	-	-
150	58	36	13	6	-	-
175	84	54	31	15	15	15

Os tempos de retorno ao estado normal, à sedação leve e profunda e à anestesia leve ajustaram-se a modelos quadráticos crescentes em resposta à variação da concentração, indicando que aumentos na concentração levam a aumentos no tempo de retorno (FIGURA 83).

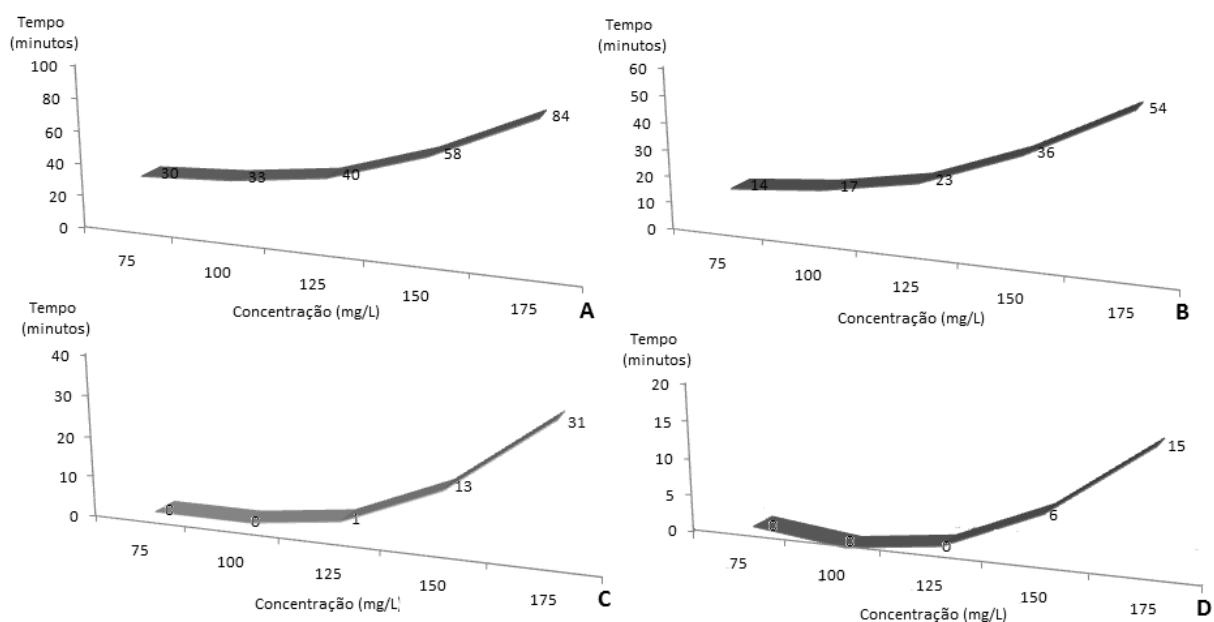


FIGURA 83 – Valores ajustados pela regressão dos tempos de retorno ao estado normal (A), à sedação leve (B), à sedação profunda (C) e à anestesia leve (D) em função da concentração de mentol, de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), pesando entre 120g e 160g.

Os tempos médios de retorno à anestesia profunda e cirúrgica foram, em ambos os estágios anestésicos, de 15 ± 7 min. Porém, como relatado anteriormente esses valores são referentes a duas observações, logo, com baixa significância e por isso, descartados nas observações posteriores.

Assim, com base nos resultados obtidos, para esta classe de peso (120g a 160g), não foi possível determinar uma concentração que induzisse uma parcela representativa da população a todos os estágios de anestesia (A_1 , A_2 , B_1 , B_2 e B_3), uma vez que, os dois últimos estágios foram alcançados por, em média, 12% e 6% da população amostral, respectivamente. Todavia, para o manejo dos animais (triagem, pesagem e mensuração), em que apenas a sedação leve é suficiente para acalmar os animais e facilitar o manejo do operador, as dosagens de 75 mg/L e 100 mg/L podem ser utilizadas, sedando as rãs por até 4h e com o restabelecimento do comportamento normal após aproximadamente 30min.

Para o transporte dos animais, por até 333 km (considerando a velocidade média de 80 Km/h), em que a sedação profunda é indicada, visando à redução das atividades metabólicas, a dosagem de 125 mg/L pode ser utilizada, com o restabelecimento do comportamento normal das rãs após um período de recuperação de 40min em água livre de anestésico.

5.3.4. Benzocaína, Eugenol e Mentol

Para possibilitar uma comparação entre os anestésicos foi estabelecido um sistema de classificação por pontos, de modo que, cada anestésico foi classificado em "A", "B" e "C", de acordo com o desempenho de cada parâmetro avaliado.

Na escolha de anestésico as principais características determinantes para seleção são a eficácia em baixas concentrações ou dosagens, menor tempo de indução e recuperação e facilidade de manutenção (ROSS e ROSS, 2008; OKAMOTO *et al.*, 2009; MARKING e MEYER, 1985). O tempo de manutenção desejável de um anestésico depende da finalidade da indução anestésica, se for para transporte a longas distâncias, o ideal é que o composto forneça maior tempo de sedação. Já, para o manejo diário ou transporte a curtas distâncias, a manutenção à sedação por longos períodos não é necessária, sendo indesejável.

Neste trabalho verificamos a possibilidade de manter os girinos anestesiados por um longo tempo, logo a manutenção longa foi uma característica desejável.

Assim, de acordo com esses conceitos, cada um dos parâmetros foi classificado em "A", "B" ou "C", o que forneceu ao anestésico avaliado, um saldo de 3, 2 ou 1 ponto, respectivamente, para cada característica avaliada (concentração, tempo de indução e tempo de retorno), como exemplificado na Tabela 85. A partir do somatório do saldo parcial de cada um dos anestésicos, nas quatro classes de peso, determinou-se o agente anestésico de melhor desempenho geral.

TABELA 85 – Esquema de pontos dos compostos anestésicos (eugenol, benzocaína e mentol), por classe de peso, em função dos parâmetros: concentração, tempo de indução, tempo de manutenção e tempo de retorno

	Concentração	Indução	Manutenção	Retorno	Classe de peso (saldo parcial)
Classe de peso 1 (5g-10g)					
Eugenol	B (2 pontos)	A (3 pontos)	B (2 pontos)	B (2 pontos)	9 pontos
Benzocaína	A (3 pontos)	A (3 pontos)	A (3 pontos)	C (1 ponto)	10 pontos
Mentol	C (1 ponto)	B (2 pontos)	C (1 ponto)	A (3 pontos)	7 pontos
Classe de peso 2 (20g-30g)					
Eugenol	B (2 pontos)	C (1 ponto)	C (1 ponto)	C (1 ponto)	5 pontos
Benzocaína	C (1 ponto)	B (2 pontos)	A (3 pontos)	B (2 pontos)	8 pontos
Mentol	A (3 pontos)	A (3 pontos)	B (2 pontos)	A (3 pontos)	11 pontos
Classe de peso 3 (80g-100g)					
Eugenol	C (1 ponto)	C (1 ponto)	C (1 ponto)	A (3 pontos)	6 pontos
Benzocaína	A (3 pontos)	B (2 pontos)	A (3 pontos)	C (1 ponto)	9 pontos

Mentol	B (2 pontos)	A (3 pontos)	B (2 pontos)	B (2 pontos)	9 pontos
Classe de peso 4 (120g-160g)					
Eugenol	B (2 pontos)	B (2 pontos)	C (1 ponto)	C (1 ponto)	6 pontos
Benzocaína	A (3 pontos)	C (1 ponto)	B (2 pontos)	B (2 pontos)	8 pontos
Mentol	C (1 ponto)	A (3 pontos)	A (3 pontos)	A (3 pontos)	10 pontos
Parâmetros (saldo parcial)					
Eugenol	7 pontos	7 pontos	5 pontos	7 pontos	
Benzocaína	10 pontos	8 pontos	11 pontos	6 pontos	
Mentol	7 pontos	11 pontos	8 pontos	11 pontos	

Se avaliarmos os parâmetros (concentração, tempo de indução, tempo de manutenção e tempo de retorno) individualmente por classe de peso, nas classes 1, 3 e 4 a benzocaína apresentou os melhores resultados, sendo eficaz na indução de todos os estágios anestésicos com as menores concentrações (FIGURA 84). Porém, na classe de peso 2 (20g-30g) a benzocaína apresentou os piores resultados nos estágios B₂ e B₃ e equiparou-se ao mentol, que obteve os melhores resultados, nos estágios A₁ e A₂ (FIGURA 84B).

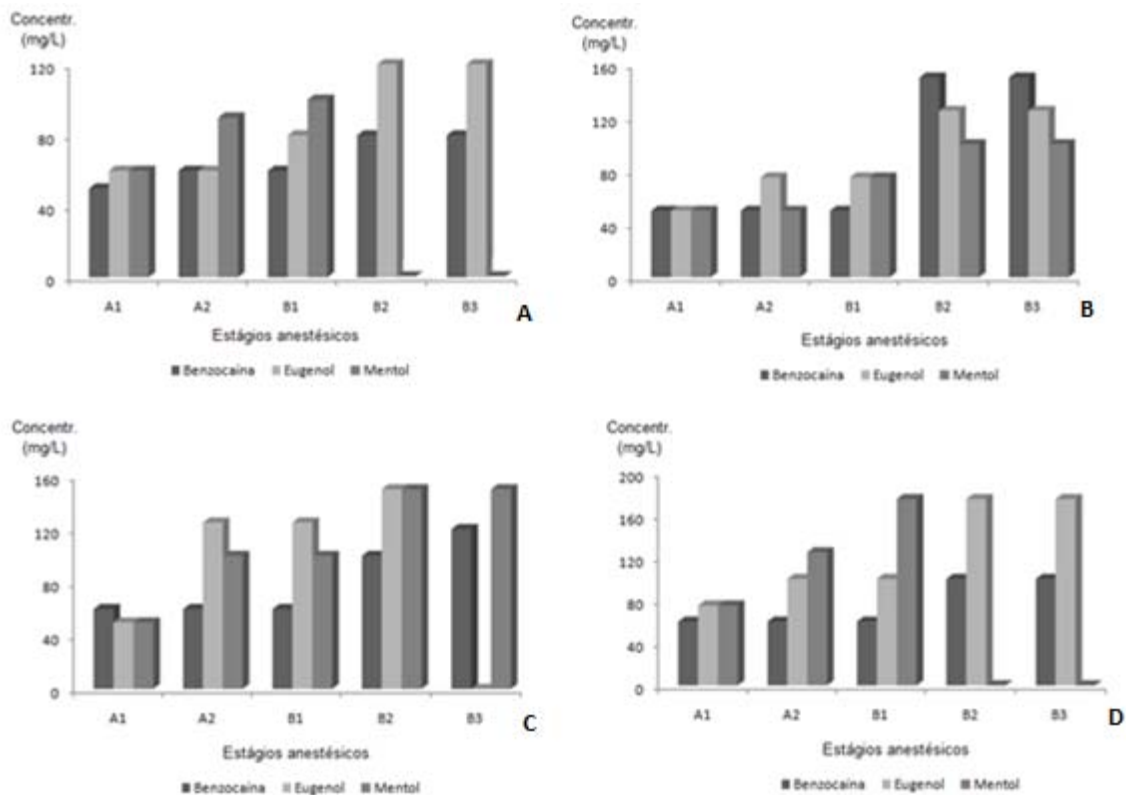


FIGURA 246 – Gráficos comparativos das concentrações recomendadas (mg/L) para indução à sedação leve (A₁), à sedação profunda (A₂), à anestesia leve (B₁), à anestesia profunda (B₂) e à anestesia cirúrgica (B₃) da benzocaína, do eugenol e do mentol, em função da classe de peso avaliada 5g-10g (A), 20g-30g (B), 80g-100g (C) e 120g-160g (D).

Com relação ao tempo de indução, na classe de peso 1, o eugenol e a benzocaína foram equivalentes e apresentaram os melhores resultados. Nas classes seguintes, o melhor desempenho foi obtido pelo mentol e o piores, pelo eugenol (classes de peso 2 e 3), e pela benzocaína (classe de peso 4).

Quanto ao tempo de manutenção, a benzocaína se sobre saiu aos outros dois nas classes de peso 1, 2 e 3 e, na classe de peso 4, apresentou valores intermediários entre o mentol (melhor desempenho) e o eugenol. No quarto parâmetro avaliado (TR) o mentol apresentou os melhores resultados nas classes de

peso 1, 2 e 4 e na classe de peso 3, desempenho intermediário entre o eugenol (melhor desempenho) e a benzocaína.

Assim, considerando todas as classes de peso, a benzocaína obteve os melhores resultados quanto à concentração e tempo de recuperação, enquanto que o mentol e o eugenol foram equivalentes.

Gonçalves *et al.* (2008), entretanto, ao avaliarem o mentol e o eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) concluíram que ambos os compostos são eficientes na substituição da benzocaína, mas, a concentração de mentol requerida foi superior a do eugenol, porém, equivalente à da benzocaína.

Quanto ao tempo de indução, a benzocaína e o eugenol obtiveram resultados semelhantes, enquanto que, o mentol se sobre saiu. Com relação ao tempo de manutenção, a benzocaína apresentou os melhores resultados, seguido pelo mentol e pelo eugenol, que obteve os piores resultados.

Porém, se avaliarmos os anestésicos apenas por classe de peso, considerando o somatório dos desempenhos obtidos em cada um dos parâmetros avaliados (concentração, tempos de indução, manutenção e retorno) temos que, na classe de peso 1, a benzocaína e o eugenol foram equivalentes e apresentaram os melhores resultados, enquanto que nas classes seguintes, o melhor desempenho foi obtido pelo mentol, seguido pela benzocaína e pelo eugenol. Contudo, na classe de peso 3, o mentol e a benzocaína obtiveram resultados semelhantes.

Embora os três anestésicos sejam eficientes na indução anestésica de rãs-touro pós-metamórficas, o mentol e a benzocaína, em geral, (considerando todos os

parâmetros avaliados em cada uma das classes de peso), se destacaram em relação ao eugenol.

Oliveira (2009), ao avaliar a eficácia da benzocaína, do mentol e do eugenol, em reprodutores de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e matrinxã (*Brycon cephalus*), concluiu que os três anestésicos são eficazes na indução anestésica nas três espécies estudadas, apresentando desempenhos semelhantes tanto em pacus quanto em matrinxãs. Porém, em tilápias, o mentol necessitou de maiores concentrações anestésicas (200mg/L) para a indução dos animais a anestesia cirúrgica, seguida pelo eugenol (150 mg/L) e pela benzocaína (100 mg/L), que obteve o melhor resultado.

Valente (2009), ao avaliar os mesmos anestésicos citados anteriormente, mas em reprodutores de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e trairão (*Hoplias lacerdade*), concluiu que, nas três espécies avaliadas, apenas a benzocaína e o eugenol são eficientes para a indução à anestesia.

Anzileiro *et al.* (2008), ao avaliarem quatro diferentes anestésicos para o manejo de jundiás (*Rhamdia quelen*), entre eles o mentol, a quinaldina, o óleo de cravo e a benzocaína, concluíram que para essa espécie o eugenol e a quinaldina são os anestésicos mais seguros e eficazes.

Okamoto *et al.* (2009), ao compararem a benzocaína e o eugenol como anestésico para juvenis do pampo (*Trachinotus marginatus*), concluíram que ambas as substâncias são bons anestésicos mas, em termos econômicos (custo/benefício), a benzocaína apresenta melhores resultados.

Na espécie estudada (*Lithobates catesbeianus*), tanto a benzocaína quanto o mentol e o eugenol foram eficientes na indução anestésica de animais pós-

metamórficos. Mas, considerando todas as classes de peso avaliadas e todos os parâmetros avaliados, em geral, o eugenol apresentou os piores resultados além de ser o único composto avaliado a apresentar efeitos negativos como, o prolapso gástrico e a possível irritação da superfície da pele dos animais, hipótese levantada em função da produção excessiva de muco durante a indução anestésica. A benzocaína e o mentol, além de não apresentarem efeitos negativos visíveis, apresentaram os melhores resultados gerais (menores concentrações, menores tempos de indução e retorno e maiores tempos de manutenção), sendo equiparáveis.

6. CONCLUSÕES

O eugenol, o mentol e a benzocaína são anestésicos de fácil manipulação, fácil aquisição, seguros para os operadores, com boa margem de segurança para rã-touro, e eficazes na indução de animais pré e pós-metamórficos, não só à sedação como também à anestesia.

Na fase pré-metamórfica (15 a 75 dias de idade) as dosagens mais indicadas de eugenol, mentol e benzocaína para sedação dos animais ficaram entre 10mg/L a 20 mg/L, 10mg/L a 40 mg/L e 15 mg/L a 45 mg/L, respectivamente. Para a anestesia as concentrações variaram de 20mg/L a 30 mg/L, para o eugenol; de 25mg/L a 45 mg/L, para o mentol e de 20 mg/L a 55 mg/L, para a benzocaína.

Para o transporte de girinos as dosagens mais indicadas situaram-se entre 18 mg/L a 30 mg/L, para a benzocaína; 10 mg/L a 15 mg/L, para o eugenol e 16 mg/L a 23 mg/L, para o mentol.

Na classe de peso 1 (5g-10g), todos o estágios anestésicos foram alcançados nas dosagens de 80 mg/L de benzocaína e 120 mg/L de eugenol, enquanto que, nas classes de peso 2 (20g-30g), 3 (80g-100g) e 4 (120-160g) as dosagens foram, respectivamente, de 150 mg/L de benzocaína, 120 mg/L de eugenol e 100 mg/L de mentol; 120 mg/L de benzocaína e 150 mg/L de eugenol e mentol; 175 mg/L de eugenol.

Em todas as classes de peso avaliadas, a sedação leve foi obtida entre as dosagens de 50 mg/L a 75 mg/L pelos três anestésicos.

Nas fases pré-metamórficas (15 dias de idade a 75 dias de idade), o composto anestésico que apresentou o melhor desempenho, considerando concentração utilizada e os tempos de indução, manutenção e retorno, tanto para

sedação quanto para anestesia de girinos de rã-touro, foi o eugenol, enquanto que o mentol e a benzocaína apresentaram resultados equivalentes.

Todavia, durante a avaliação do uso do eugenol foi constatado a ocorrência de reações tóxicas, mesmo que leves, tanto em animais pré-metamórficos quanto pós-metamórficos (prolapso gástrico e irritação da pele), além de causar leve desconforto aos manipuladores.

Na simulação de transporte, em todas as faixas etárias avaliadas, os agentes anestésicos mais eficientes para sedação de girinos de rã-touro por 24 horas foram a benzocaína e o mentol.

Na fase pós-metamórfica, considerando todas as classes de peso avaliadas (5g a 160g), em geral, o mentol e a benzocaína se destacaram em relação ao eugenol, apresentando os melhores resultados.

Uma vez que, a eficácia e a equivalência do mentol e da benzocaína foram comprovadas, a escolha entre um ou outro fica a critério do operador, este deve avaliar, então, questões como facilidade de aquisição no comércio local e preço, e optar pelo mais vantajoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J. L. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. **The Progressive Fish Culturist**, v.50, p. 59-60, 1988.

ALLEN, J. L.; VANG, G.; STEEGE, S.; XIONG, S. Solubility of benzocaine in fresh water. **The Progressive Fish Culturist**, v.56, p.145-146, 1994.

Amphibian Anesthesia Guidelines. **Iowa State University of Science and Technology**. Ames, 29 mai. 2008. Disponível em:<
http://www.lar.iastate.edu/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=95>. Acesso em: 27 mar. 2008.

ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v.17, n.2, p.301–307. 1997.

ANTOGNINI, J. F. Hypotermia eliminates isoflurane requirements at 20°C. **Anesthesiology**, v.78, n.6, p. 1152-1156, 1993.

ANTUNES, M. I. P. P.; SPURIO, R. S.; GODOI, D. A.; GRUMADAS, C. E. S.; DA ROCHA, M. A. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*). **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.151-156, 2008.

ANZILEIRO, D.; KREUTZ, C. L.; BARCELLOS, G. J. L. Avaliação de quatro anestésicos para sua utilização no manejo de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Anais... 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2008, Gramado-RS. Disponível em: www.sovergs.com.br/conbrasvet2008/anais/cd/resumos/R0813-1. Acesso em: 03 de Dezembro de 2010.

AOSHIMA, H.; HANAMOTO, K. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.743-748, 1999.

ATSUSANE, T. Clove oil or dhydroeugenol for controlling oxygen in the human body. **Japan Kokai Tokkyo Koho**, v.227, p.6, 1991.

AUPERIN, B.; BAROILLER, J. F.; RICORDEL, M. J.; FOSTIER, A.; PRUNET, P. Effect of Confinement Stress on Circulating Levels of Growth Hormone and Two Prolactins in Freshwater-Adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.108, n.1, p.35-44, 1997.

BALASKO M; CABANAC M. Behavior of juvenile lizards (*Iguana iguana*) in a conflict between temperature regulation and palatable food. **Brain Behavior and Evolution**, v.52, n.6, p.257-62, 1998.

BARBOSA, A. L. F.; TAKATA, R.; PORTELLA, M. C. *et al.* Respostas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* à anestesia com diferentes concentrações de benzocaína. In: AQUACIENCIA 2006, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves, 2006 (CD-ROM).

BARLOW, L. A. The biology of amphibian taste. **Amphibian Biology**, v.3, p.743-782. 1998.

BARTER, L. S.; MARK, L. O.; SMITH, A. C.; ANTOGNINI, J. F. Isoflurane Potency in the Northern Leopard Frog *Rana pipiens* is Similar to That in Mammalian Species and is Unaffected by Decerebration. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.757-763. 2007.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.517-525. 2002.

BERNSTEIN, P.; DIGRE, K.; CREEL, D. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the fish anesthetic MS-222. **American Journal of Ophthalmology**, v.124, p.843-844. 1997.

BIANCONI, M. L.; SCHREIER, S. RPE study of membrane partitioning, orientation and membrane-modulated alkaline hydrolysis of a spin-labeled benzoic acid ester. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, n.6, p.2483-2487, 1991.

BITTENCOURT, F.; NEU, D. H.; de SOUZA, E.; RORATO, R. R.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. In: AQUANUTRI, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA e ZOOTECNIA, **Anais...**, 3º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes, 2009.

BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, v.14, n.6, p.569-575, 2006.

BOWSER, P. R. Anaesthetic options for fish. In: GLEED, R. D.; LUDDERS, J. W. (Ed.). **Recent advances in veterinary anesthesia and analgesia: Companion animals**. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, United State of America, 2001. Disponível em:<
http://www.ivis.org/advances/Anesthesia_Gleed/bowser/chapter.asp?LA=1>. Acesso em : 5 dez 2009.

BRIDGES, C. D. B. Effects of light and darkness on the visual pigments of amphibian tadpoles. **Vision Research**, v.14, n.9, p.779-793, 1974.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v.142, p.524-526, 1986.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Animal welfare: concept and related issues – Review. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.1-11, 2004.

BROWN, H. H. K.; TYLER, H. K.; MOUSSEAU, T. A. Orajel® as an amphibian anesthetic: refining the technique. **Herpetological Review**, v.35, n.3, p. 252, 2004.

BULLOCK, T. H.; BODZNICK, D. A. NORTHCUTT, R. G. The phylogenetic distribution of electroreception: Evidence for convergent evolution of a primitive sense modality. **Brain Reserch**, v.6, p.25-46, 1983.

BUTLER, A. B.; HODOS, W. Tegmentum and tori. In: **Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation**. New York: John Wiley & Sons. 2 ed. 715p. 2005.

CAGNOLATI, D. C.; TSUHA, G. F.; CAGNOLATI, C. A. Anatomia e fisiologia hepática. In: CANGIANI, L. M.; POSSO, I. P.; POTERO, G. M. B.; NOGUEIRA, C. S. (Ed.). **Tratado de Anestesiologia - SAESP**. 6 ed. Volume 1. São Paulo: Ateneu, 2007. 1012p.

CAKIR, Y.; STRAUCH, S. M. Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). **Pharmacological Report**, v.57, p.467-474, 2005.

CAMARGO FILHO, C. B. **Características alimentares e potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)**. 70p. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther) during transport. **Aquaculture Research**, v.32, p.297–304. 2001.

CARNEIRO, P. e URBINATE, E. Plasma electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* transported under influence of benzocaine. **Journal of Applied Aquaculture**, v.11, n.4, p.1-13, 2001.

CARRAGHER, J. F.; SUMPTER, J. P.; POTTINGER, T. G.; PICKERING, A. D. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. **General and Comparative Endocrinology**, v.76, n.2, p.310-321, 1989.

CASILLAS, E.; SMITH, L. S. The effects of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.10,n.5, p.481-491, 1977.

CASTRO, M. V. G. R. P.; TAKAMURA, A. E.; MARQUES, B. G. S. P.; CORREIA, Y. G.; RIBEIRO FILHO, O. P. Uso de diferentes concentrações de eugenol para sedação e transporte de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). In: SIMPÓSIOS DA UFV. **Anais...** XIX de Iniciação Científica – SIC; IX Mostra Científica da pós-graduação – SIMPÓS; VII de Extensão Universitária - SEU e III de Ensino – Sen, 2009.

CASTRO, M. V. G. R. P.; TAKAMURA, A. E.; RIBEIRO FILHO, O. P.; ARRUDA, L. C.; PINHEIRO, L. C. Avaliação de três diferentes anestésicos durante o transporte de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). In: II SIMPOSIO BRASILEIRO DE AGROPECUÁRIA SUSTENTÁVEL, Universidade Federal de Viçosa, **Anais...**, II Simposio Brasileiro de Agropecuária Sustentável, 2010, CD-ROM, 2010.

CATTON, W. T. Cutaneous mechanoreceptors. In: Llinas, R e Precht, W. (Ed.). **Frog neurobiology: a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p.629-642.

CECALA, K. K., PRICE, E. J., DORCAS, M. E. A Comparison of the Effectiveness of Recommended Doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for Amphibian Anesthesia. **Herpetological Review**, v.38, n.1, p.63-66, 2007.

CESTELE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated channels. **Biochimie**, v.82, p.883-892, 2000.

CHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction gamete quality and progeny. **Aquaculture**, v.197, p.3-24, 2001.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concept of stress and stress system disorders. **JAMA**, v.267, p.1244-1252, 1992.

CLIFF, M. A.; GREEN, B. G. Sensory irritation and coolness produced by menthol: evidence for selective desensitisation of irritation. **Physiology & Behavior**, v.56, p.1021-1029, 1994.

CODDINGTON, E. J.; CREE, A. Effects of acute captivity stress on plasma concentrations of corticosterone and sex steroids in female whistling frogs, *Litoria ewingi*. **General and Comparative Endocrinology**, v.100, p.33-38, 1995.

COLLINS, V. J. **Princípios de anestesiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1194p. 1978.

COOK, S. J., SUSKY, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and psychological assessment of low concentrations of clove oil

anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmonides*). **Aquaculture**, v.239, p.509-529, 2004.

COVINO, B. G.; VASSALO, H. G. **Anestésicos Locais: Mecanismos de ação e uso clínico**. New York: Grune and Stratton Inc. 176p. 1985.

CRAWSHAW, G. J. Amphibian medicine. In: FOWLER, M. e MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. 617p.

CRESCITELLI, F. The visual pigment system of *Xenopus laevis*: Tadpole and adults. **Vision Research**, v.13, n.4, p.855-865, 1973.

CUNHA, F.E.A.; ROSA, I.L. Anesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 1504-1512, 2006.

de JONG, R. H.; HERSHEY, W. N.; WAGMAN, I. H. Nerve conduction velocity during hypothermia in man. **Anesthesiology**, v.27, n.6, p.805-810, 1966.

de PAULA, E.; SCHREIER, S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.877-94, 1996.

DELBON, M. C. **Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DELFINO, J. D.; VALE, N. Farmacologia dos anestésicos locais. In: **Anestesia Peridural: Atualização e perspectiva**. São Paulo: Atheneu, 2001. 402p.

DENVER, R. J. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. **Hormones and Behavior**, v.31, p.169-179, 1997.

DENVER, R. J. Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the western spadefoot toad, *Scaphiopus hammondi*. **General and Comparative Endocrinology**, v.110, p.326-336, 1998.

DEWEY, T. *Rana pipiens*. Animal Diversity Web, 1999. Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rana_pipiens.html>. Acesso em: 08 de Nov. 2008.

DODD, J.; CASTELLUCCI, V. F. Smell and taste: the chemical senses. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J; JESSEL, T. (Ed.). **Principles of Neural Science**. 3. ed. New York: Elsevier, 1991. 1414p.

DONNER, K. O.; REUTER, T. Visual pigments and photoreceptor functions. In: Llinas, R. e Precht, W. (Ed.). **Frog neurobiology: a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p. 251-277.

ECCLES, R. Role of cold receptors and menthol in thirst, the drive to breath and arousal. **Appetite**, v.34, p.29-35, 2000.

EINARSDOTTIR, I. E.; NILSSEN, K. J.; IVERSEN, M. Effects of rearing stress on Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) antibody response to a non-pathogenic antigen. **Aquaculture**, v.31, p.923-930. 2000a.

EINARSDOTTIR, I. E.; NILSSEN, K. J.; OREN, S. O.; IVERSEN, M. Temperature influence on Artic charr (*Salvelinus alpinus L.*) antibody response to a cellular antigen. **Polar Biology**, v.23, p.231-235. 2000b.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, p. 71-75, 2005.

FERNANDES, F.; ISMAEL, P. C. Conceitos farmacocinéticos fundamentais. In: CANGIANI, L. M.; POSSO, I. P.; POTERIO, G. M. B.; NOGUEIRA, C.S. (Ed.). **Tratado de Anestesiologia - SAESP**. 6. ed. Volume 1. São Paulo: Ateneu, 2007. 1012p.

FERREIRA, C. M.; DIAS, D. C.; FRANÇA, F. M.; BARBOSA, C. J. S. Estresse e sistemas de criação. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA 11. Bragança Paulista, 16-19/jul 2001. **Anais...** São Paulo: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura. p.37-40. 2001.

FINSTAD, B.; IVERSEN, M.; SANDODDEN, R. Stress-reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt in Norway. **Aquaculture**, v.222, p.203-214. 2003.

FISCHER, I. U.; DENGLER, H. J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids. **Journal of Chromatography**, v.525, p.369-377, 1990.

FISCHER, I. U.; von UNRUH, G. E.; DENGLER, H. J. The metabolism of eugenol in man. **Xenobiotica**, v.20, n.2, p.209-222, 1990.

Foster, R. G.; Provencio, L.; Hudson, D.; Fiske, S.; De Grip, W.; Menaker, M. 1991. Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). **Journal of Comparative Physiology A – Sensory, neural and behavior physiology**, v.169, p.39-50, 1991.

FOX, H.; WHITEAR, M. Observations of Merkel cells in amphibians. **Biology of the Cell**, v.32, p.223-232. 1978.

FRACETO, L. F.; de PAULA, E. Interação de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectrofotometria de infravermelho. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v.27, n.1, p.27-35, 2006.

FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Molecular and cellular mechanism of general anesthesia. **Nature**, v.367, p.607-614, 1994.

FRAZIER, D. T.; NARAHASHI, T.; YAMADA, M. The site of action and active form of local anesthetics. Experiments with quaternary compounds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.171, n.1, p.45-51, 1970.

FREAKE, M. J.; MUHEIM, R.; PHILLIPS, J. B. Magnetic maps in animals: a theory comes of age? **The Quarterly Review of Biology**, v.81, p.327-347, 2006.

FREDRICKS, K.T.; GINGERICH, W.H.; FATER, D.C. Comparative cardiovascular effects of four fishery anesthetics in spinally transected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology C – Toxicology and Pharmacology**, v.104, n.3, p.477-483, 2003.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; MANNELLI, L. C.; MAZZANTI, G.; BAGHIROLI, L.; BARTOLINI, A. Local anesthetic activity of (+)- and (-)-menthol. **Planta Medicinal**, v.67, p.174-176, 2001.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v.322, p.145-148, 2002.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Bem estar animal: um conceito legítimo para peixes? **Revista de Etologia**, v.8, n.1, p. 51-61, 2006.

GALLOVÁ, J.; BALGAVÝ, P. Interaction of local anesthetic heptacaine homologs with phosphatidylcholine bilayers: spin label ESR study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1325, n.2, p.189-196, 1997.

GANG, J. H.; SHIN, G. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.37, n.2, p.132-135, 2010.

GARVEY, N. *Xenopus laevis*. Animal Diversity Web, 2000. Disponível em: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Xenopus_laevis.html. Acesso em: 08 de nov. 2008.

GERWICK, L.; DEMERS, N. E.; BAYNE, C. J. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. **Comparative Biochemistry and Physiology A- Molecular and Integrative Physiology**, v.124, p.329-334, 1999.

GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of fisheries Management**, v.7, p.288-292, 1987.

GIMBO, R. H.; SAITA, M. V.; GONÇALVES, A. D. N.; TAKAHASHI, L. S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p.350-357, 2008.

GLENNEMEIER, K.; DENVER, R. J. Developmental changes in interrenal responsiveness in anuran amphibians. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.565-573, 2002b.

GLENNEMEIER, K.; DENVER, R. J. Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. **Journal of Experimental Zoology**, v.292, n.1, p.32-40. 2002a.

GOMES, L. C. **Transporte de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**. 100p. Tese de Doutorado em Aquacultura – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM. 2002.

GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte do tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.283-290, 2003.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, A. R. M. Efficacy of benzocaine as a anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.32, n.4 p.426-431, 2001.

GONÇALVES, A. F. N.; SANTOS, E. C. C.; FERNADES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum – Animal Science**, v.30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, p.183-190, 1960.

GOULET, F.; HÉLIE, P.; VACHON, P. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. **Journal of American Association for Laboratory Animal Science**, v.49, n.4, p. 460-463, 2010.

GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v.1, p.46-53, 2004.

GUENETTE, S. A.; BEAUDRY, F.; MARIER, J. F.; VACHON, P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.29, p.265-270, 2006.

GUENETTE, S. A.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.34, p.164-170, 2007b.

GUENETTE, S. A.; ROSS, A.; MARIER, J. F.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.562, p.60-67, 2007a.

GUENETTE, S. A.; UHLAND, F. C. HÉLICE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, p.262-265, 2007c.

GUERIT, J. M. The use of somatosensory evoked potentials to determine the optimal degree of hypothermia during circulatory arrest. **Journal of Cardiac Surgery**, v.9, n.5, p. 596-603, 1994.

GUPTA, S. P. QSAR (quantitative structure-activity relationship) studies on local anesthetics. **Chemical Reviews**, v.91, n.6, p.1109-1119, 1991.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1264p. 2002.

HAESLER, G.; MAUE, D.; GROSSKREUTZ, J.; BUFLER, J.; NENTWIG, B.; PIEPENBROCK, S.; DENGLER, R.; LEUWER, M. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. **European Journal of Anesthesiology**, v.19, p.571-579, 2002.

HAJEK, G. J.; KLYSZEJKO, B.; DZIAMAN, R. The anaesthetic effects of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.36, p. 93-97, 2006.

HALL, A. C.; TURCOTTE, C. M.; BETTS, B. A.; YEUNG, W. Y.; AGYEMAN, A. S.; BURK, L. A. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v.506, p.9-16, 2004.

HALL, L. W.; CLARKE, K. W.; TRIM, C. M. **Veterinary anaesthesia**. London: Saunders. 10. ed. 561p. 2001.

HANAMOTO, D. T.; SIMONE, D. A. Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. **Journal of Neurophysiology**, v.90, p.566-577. 2003.

HARBUZ, M. S.; LIGHTMAN S. L. Stress and the HPA axis: acute, chronic and immune interactions. **Journal of Endocrinology**, v.134, p.327–339, 1992.

HARRIS, B. Menthol: A review of its thermoreceptor interactions and their therapeutic applications. **The International Journal of Aromatherapy**, v.16, p.117-131, 2006.

HASAN, M.; BART, A. N. Improved survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan) and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) fingerlings using low-dose quinaldine and benzocaine during transport. **Aquaculture Research**, v.38, p.50-58, 2007.

HASTEIN, T.; SCARFE, A. D.; LUND, V. L. Science-based assessment of welfare: aquatic animals. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v.24, n. 2. p.529-547, 2004.

HAYTON, W. L.; SZOKE, A; KEMMENOE, B. H.; VICK, A. M. Disposition of benzocaine in channel catfish. **Aquatic Toxicology**, v.36, p.99-113, 1996.

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

HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; SCHUMACHER, J.; STAHL, S.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Comparison of isoflurane and sevoflurane anesthesia after premedication with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, n. 2, p.169–175, 2005.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 856p. 2003.

HILLE, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. **The Journal of General Physiology**, v.69, n.4, p.497-515, 1977.

HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; FERREIRA, R. A.; BULGARELLI, A. L. A.; COSTA, T. R.; PADUA, S. B. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n.3, p.303-307, 2008.

HODGKIN, A.L; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **Journal of Physiology**, v.117,n.4, p.500-544, 1952.

HONDEGHEM, L. M.; KATZUNG, B. G. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.472, n.373-398, 1977.

HOSKONEN, 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.

HOWE, G. E.; BILLS, T. D.; MARKING, L. L. Removal of benzocaine from water by filtration with activated carbon. **The Progressive Fish Culturist**, v.52, n.1, p.32-35, 1990.

HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDOE, P.; TURNBULL, J. F. Current Issues in Fish Welfare. **Journal of Fish Biology**, v.68, p.332-372, 2006.

IASP Subcommittee on Taxonomy. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain** (Suppl), v.3, p.5217, 1986.

INAGAKI, S.; SENBA, E.; SHIOSAKA, S.; TAKAGI, H.; KAWAI, Y.; TAKATSUKI, K.; SAKANAKA, M.; MATSUZAKI, T.; TOHOYAMA, M. Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the frog brain and spinal cord: immunohistochemical analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v.201, p.243-254, 1981.

INOUE, L. A. K. A. **Respostas do matrinxã (*Brycon cephalus*) a anestésicos e estressores**. 2005. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

INOUE, L. A. K. A.; AFONSO, L. O. B.; IWAMA, G. K.; MORAES, G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v.35, n.2, p 289-295, 2005.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS, C. N.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, p.943-947, 2003.

INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, v.2, p.10-15, 2004.

IVERSEN, M. FINSTAD, B.; McKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolt, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A. The effect of AQUI-S[®] sedation on primary, secondary and tertiary stress responses during salmon smolt (*Salmon salar L.*) transport and transfer to sea. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, n.2, p. 216-225, 2009.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A.; FINSTAD, B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmon salar L.* transport and transfer to sea. **Aquaculture Research**, v.44, p.233-241. 2009.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S[™] and Benzoak[®] as anesthetic in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress reducing capacity. **Aquaculture**, v.221, p.549-566, 2003.

JADHAV, B. K.; KHANDELWAL, K. R.; KETKAR, A. R.; PISAL, S. S. Formulation and evaluation of mucoadesive tablets containing eugenol for the treatment of

periodontal disease. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.30, p.195-203, 2004.

JAEGER, C. B.; HILLMAN, D. E. Morphology of gustatory organs. In: Llinás, R. e Precht, W. (Ed.). **Frog neurobiology, a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p.588-606.

JAMES, D.; ROSE, J. D. The Neurobehavioral Nature of Fishes and the Question of Awareness and Pain. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, n.1, p.1-38. 2002.

JORDT, S.; McKEMY, D.; JULIUS, D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermoregulation. **Current Opinion in Neurobiology**, v.13, p.1-6, 2003.

KATZ, A. M. Selectivity and toxicity of antiarrhythmic drugs: molecular interaction with ion channels. **The American Journal of Medicine**, v.104, p.179-195, 1998.

KEENE, J. L .; NOAKES, D. G. MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, v.286, p.301-308, 2009.

KIKUYAMA, S.; KAWAMURA, K.; TANAKA, S.; YAMAMOTO, K. Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. **International Review of Cytology**, v.145, p.105-148, 1993.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v.232, p.265-277, 2004.

KING, W.V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, v.36, p.1442-1449, 2005.

KLOAS, W.; HANKE, W. Neurohypophysial hormones and steroidogenesis in the interrenals of *Xenopus laevis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.80, p.321-330, 1990.

KOYAMA, H.; LEWIS, E. R.; LEVERENZ, E. L.; BAIRD, R. A. Acute seismic sensitivity in the bullfrog ear . **Brain Research**, v.250, n.1, p.168-172, 1982.

KRASOWSKI, M. D.; HARRISON, N. L. General anesthetic actions on ligand-gated ionic channels. **Cellular and Molecular Life Science**, v.55, p.1278-1303, 1999.

LAEKEMAN, G. M.; HOOF, V. L.; HAEMERS, A.; BERGHE, V. A. D.; HERMAN, A. G.; VLICTINK, A. K. Eugenol, a valuable compound for in vitro experimental research and worldwide for further in vivo investigation. **Phytotherapy Research**, v.4, p.90-96, 1990.

LAFORTUNE, M.; MITCHELL, M. A.; SMITH, J. A. Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. **The journal of herpetological Medicine and Surgery**, v.11, p.13-18, 2001.

LANNO, M. J. Neuromast topography in anuran amphibians. **Journal of Morphology**, v.191, p.115-129, 1987.

- LEE, A. G. Model for action of local anaesthetics. **Nature**, v.262, p.545-548, 1976.
- LEWIS, E. R.; LOMBARD, R. E. The amphibian inner ear. In: Fritsch, B. Ryan, M. J., Wilczynski, W., Hetherington, T. E., Walkowiak, W. (Ed.). **The evolution of the amphibian auditory system**. New York: Wiley, 1988. p.93-123.
- LICHT, P.; McCREERY, B. R.; BARNES, R.; PANG, R. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **General and Comparative Endocrinology**, v.50, p.124-145, 1983.
- LOCHYNSKI, S.; FRACKWIAK, B.; LIBROWSKI, T.; CZARNECKI, R.; GROCHOWSKI, J.; SERDA, P.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Stereochemistry of terpene derivatives. Part 3: Hydrolytic kinetic resolution as a convenient approach to chiral aminohydroxyiminocaranes with local anaesthetic activity. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.13, n.8, p.873-878, 2002.
- LOREZ, H. P.; KEMALI, M. Substance P, met-enkephalin and somastatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. **Neuroscience Letters**, v.26, p.119-124, 1981.
- LYNN, B. The fiber composition of cutaneous nerves and the classification and response of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. **Pain Reviews**, v.1, p.172-183, 1994.
- MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better fish anesthetic needed in fisheries? **Fisheries**, v.10, p.1-6, 1985.
- MARTIN, L.B. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. **General and Comparative Endocrinology**, v.163, p.70-76, 2009.

MARTOF, B.S. Territoriality in the green frog (*Rana clammatans*). **Ecology**, v.34, n.1, p.166-74, 1953.

MATTSON, N. S.; RIPLE, T. H. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol and phenoxyethanol. **Aquaculture**, v.83, p.89-94, 1989.

MAULE, A. G.; SCHRECK, C. B.; KAATTARI, S. L. Changes in the immune system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-smolt transformation and after implantation of cortisol. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.44, n.1, p.161-166, 1987.

MAX, M.; MCKINNON, P. J.; SEIDENMAN, K. J.; BARRETT, R. K.; APPLEBURY, M. L.; TAKAHASHI, J. S.; MARGOLSKEE, R. F. Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. **Science**, v.267, p.1502-1506, 1995.

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.

McDONALD, D. G.; ROBINSON, J. G. Physiological responses of lake trout to stress: Effects of water hardness and genotype. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.122, p.1146-1155, 1993.

McEWEN, B. S., WINGFIELD, J. C. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Hormones and Behavior**, v.57, p.105-111. 2010.

McKEMY, D.; NEUHAUSSER, W.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v.416, p.52-58, 2002.

MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H.; ALLEN, J. L. Metabolism and elimination of benzocaine by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Xenobiótica**, v.21, p.525-533, 1991.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S™ exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.296, p.200-206, 2009.

MEINERTZ, J. R.; STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. **Aquaculture**, v.148, p.39-48, 1996.

MEINERTZ, J. R.; STEHLY, G. R.; HUBERT, T. D.; BERNARDY, J. A. Liquid chromatographic determination of benzocaine and N-acetybenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. **Journal of Chromatography A**, v.855, p.255-260, 1999.

MINKE, B.; COOK, B. TRP channel proteins and signal transduction. **Physiological Review**, v.82, p.429-472, 2002.

MINKOFF, E. C. A. **A laboratory guide to frog anatomy**. Nova Iorque: Pergamon Press. 101p. 1975.

MIRANDA-ANAYA, M; BARTELL, P. A.; YAMAZAKI, S.; MENAKER, M. Circadian rhythm of ERG in *Iguana iguana*: role of the pineal. **Journal of Biological Rhythms**, v.15, n.2, p.163-71, 2000.

MITCHELL, M. A. Anesthetic considerations for amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.18, p. 40-49, 2009.

MITCHELL, M. A.; RIGGS, S.; SINGLETON, B. Evaluating the clinical and cardiopulmonary effects of clove oil and propofol in tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.18, p. 50-56, 2009b.

MOORE, I. T.; JESSOP, T. S. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Hormones and Behavior**, v.43, p.39-47, 2003.

MORGAN Jr, G. E; MILKHAIL, M. S.; MURRAY, M. J. **Anestesiologia Clínica**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda. 3. ed. 875p. 2006.

MYLONAS, C. C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, L. POLZONETTI-MAGNI, A. 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.

NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibitory effects of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v.43, p.2393-2400, 1992.

NARAHASHI, T.; YAMADA, M. Cationic Forms of Local Anaesthetics block Action Potentials from Inside the Nerve Membrane. **Nature**, v.223, n.5207, p.748-749, 1969.

NELSON, R.; ZUCKER, I. Absence of extra-ocular photoreception in diurnal and nocturnal rodents exposed to direct sunlight. **Comparative Biochemistry and Physiology A – Comparative Physiology**, v.69, p.145-148, 1981.

NEWMAN, L. C.; STEVENS, S. S.; WALLACE, D. R. STEVENS, C. W. Characterization of μ , κ and δ Opioid Binding in Amphibians Whole Brain Tissue Homogenates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.301, n.1, p.364-370, 2002.

NISHIJIMA, H.; UCHIDA, R.; KAWAKAMI, N.; SHIMAMURA, K.; KITAMURA, K. Role of endothelium and adventitia on eugenol-induced relaxation of rabbit ear artery precontracted by histamine. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.34, p.123-137, 1998.

NORTHCUTT, R. G. Taste buds: development and evolution. **Brain Behavior and Evolution**, v.64, p.198-206, 2004.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. **Estresse em peixes cultivados: atenuantes e agravantes para o manejo rentável**. In: Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Macapá: EMBRAPA. 2009. 723p.

OHTSU, K.; NAITO, K.; WILT, F. H. Metabolic basis of visual pigment conversion in metamorphosing *Rana catesbeiana*. **Developmental Biology**, v.10, n.2, p.216-232, 1964.

OKAMOTO, M. H.; TESSEER, M. B.; LOUZADA, L. R.; SANTOS, R. A.; SAMPAIO, L. A. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.866-870, 2009.

OKANO, T.; YOSHIZAWA, T.; FUKADA, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptor molecule. **Nature**, v.372, p.94-97, 1994.

OKAWARA, Y.; KO, D.; MORLEY, S. D.; RICHTER, D.; LEDERIS, K. In situ hybridization of corticotropin-releasing factor encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker (*Catostomus commersoni*). **Cell and Tissue Research**, v.267, p.545-549, 1992.

OLIVEIRA, A. S. VALENTE, C. O. **Uso de três anestésicos pelo método de aspersão branquial em adultos de peixes de produção**. 82p. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

OLIVEIRA, J. R.; do CARMO, J. L.; OLIVEIRA, K. K. C.; SOARES, M. C. F. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.7, p. 1163-1169, 2009.

OLSEN, R. W. Absinthe and γ -aminobutyric acid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.4417-4418, 2000.

OSTRENSKY, A. et al. Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, C. V.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. (Ed.). **Aqüicultura no Brasil bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília. CNPq, 2000. p. 354-381.

PAOLUCCI, M. ; ESPOSITOV, V.; DI FIORE, M. M.; BOTTE, V. Effects of short postcapture confinement on plasma reproductive hormone and corticosterone profiles in *Rana esculenta* during the sexual cycle. **Bollettino di Zoologia**, v.57, p.253-259, 1990.

PARK , M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological response to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2009.

PARK, M.O. et al., Anaesthetic effect of lidocaine hydrochloride sodium bicarbonate and MS-222 on the greenling (*Hexagrammos otakii*). **Journal of the Korean Fisheries Society**, v.36, p.449-453, 2003.

PEIRSON, S. N.; HALFORD, S.; FOSTER, R. G. 2009. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.364, p.2849-2865, 2009.

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

PHILLIPS, J. B.; JORGE, P. E.; MUHEIM, R. Light-dependent magnetic compass orientation in amphibians and insects: candidate receptors and candidate molecular mechanism. **Journal of the Royal Society Interface**, v.7, p.S241-S256, 2010.

PICKERING, A. D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, n.1-4, p.51-63, 1993.

PICKERING, A. D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v.100, n.1-3, p.125-139, 1992.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G.; SUMPTER, J. P.; CARRAGHER, J. F.; LE BAIL, P. Y. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v.83, n.1, p.86-93, 1991.

PINTO, L. M.; YOKAICHIYA, D. K.; FRACETO, L. F.; de PAULA, E. Interaction of benzocaine with model membranes. **Biophysical Chemistry**, v.87, n.2-3, p.213-223, 2000.

PIRES, O. C.; CONSTANTINO, E. Bioeletrogênese da membrana: transmissão sináptica. In: CANGIANI, L. M.; POSSO, I. P.; POTERO, G. M. B.; NOGUEIRA, C. S. (Ed.). **Tratado de anestesiologia SAESP**. Volume 1. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 229-236.

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

PORTZ, D. E.; WOODLEY, C. M.; CECH J. J. Stress associated impacts of short-term holding on fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.16, p.125-170, 2006.

POTTINGER, T. G.; PICKERING, A. D. The effects of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, v.80, n.2, p.264–273, 1990.

PRECHT, W. Physiology of the peripheral and central vestibular systems. In: Llinas, R. e Precht, W. (Ed.). **Frog neurobiology, a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p. 481-512.

RAGSDALE, D. S.; AVOLI, M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Research Reviews**, v.26, p.16-28, 1998.

REDDY, A. C. P.; LOKESH, B. R. Studies on anti-inflammatory activity of spice principles and dietary N-2 polyunsaturated acids on carrageenan-induced inflammation in rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.38, p.349-358, 1994.

REISS, J. O.; EISTHEIN, H. L. Comparative anatomy and physiology of chemical senses in amphibians. In: **Sensory Evolution on the Threshold Adaptations in Secondarily Aquatic Vertebrates**. Los Angeles: University of California Press, 2008. 358p.

ROCHA, G. C. Avaliação da resposta fisiológica de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) submetidos aos mecanismos estressores de captura, hipóxia e transporte. 75p. Dissertação de Mestrado em Aqüicultura e pesca – Agencia Paulista de tecnologia dos Agronegócios – Instituto de Pesca, São Paulo, SP, 2007.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. Órgãos dos sentidos. In: **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1985. p. 438- 488.

ROMERO, L. M; BUTLER, L. K. Endocrinology of stress. **International Journal of Comparative Psychology**, v.20, p.89-95, 2007.

ROSE, J. D. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, n.1, p.1–38, 2002.

ROSS, A.; GUENETTE, S. A.; HÉLIE, P.; VACHON, P. Cas de necrose cutanée chez des grenouilles africaines à griffes *Xeopus laevis* suite à une application topique d'eugénol. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, p. 1115-1117, 2006.

ROSS, B. L. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 222p.

ROSS, L.G.; BLANCO, J. S.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C.; RACOTTA, I. S.; CUEVAS, M. T. Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia. **Aquaculture Research**, v.38, n.9, p.909-917, 2007.

ROSSI, G. T.; BRITT, R. H. Effects of hypothermia on the cat brain-stem auditory evoked response. **Electroencephalograph and Clinical Neurophysiology**, v.57, n.2, p.143-155, 1984.

ROTHWELL, S. E.; BLACK, S. E.; JERRETT, A. R.; FORSTER, M. E. Cardiovascular changes and catecholamines release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawtscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and Integrative Physiology**, v.140, p.289-298, 2005.

ROUBACH, R; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v.11, n.66, p.37-40. 2001.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. 6.ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

RYAN, M. J. Synchronized calling in a treefrog (*Smilisca sila*). **Brain Behavior and Evolution**, v.29, p.196-206, 1986.

SAPOLSKY, R. M. Endocrinology of the stress response. In: BECKER, B.; BREEDLOVE, S. M.; CREWS, D. (Ed.). **Behavioral Endocrinology**. 2. ed. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology Press, 2002. p.287-325.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v.21, p.55–89, 2000.

SARTORE, T. A.; SHIMODA, E.; LAVOR, M. S. L.; LOPES, B. J. S.; TRINDADE, P. V.; CRUZ, G. M.; RIZO, W. F. 2007. Utilização do mentol no transporte de alevinos de piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl 2), p. s337- s338, 2007.

SAYDMOHAMMED, M.; KUMAR PAL, A. Anesthetic effects of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.298, p.162-167, 2009.

SCHOLZ, A. Mechanisms of local anesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. **British Journal of Anaesthesia**, v.89, p.52-61, 2002.

SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. **Aquaculture**, 197:3-24, 2001.

SCHWARTZ, J. J.; WELLS, K. D. An experimental study of acoustic interference between two species of neotropical treefrogs. **Animal Behavioral**, v.31, p.181-190, 1983.

SHAND, J.; FOSTER, R. G. The extraretinal photoreceptors of non-mammalian vertebrates. In: Archer, S. N.; Djamgoz, M. B. A.; Loew, E. R.; Patridge, J. C.; Vallergera, S. (Ed.). **Adaptative mechanisms in the ecology of vision**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 197-222.

SHIBA, Y.; SUMOMOGI, H.; NOMURA, S.; MUNEOKA, Y.; KANNO, Y. Oral chemoreceptor organs of bullfrog tadpoles during metamorphosis. **Development, Growth and Differentiation**, v.22, n.3, p.209-217, 1980.

SILVA, E. M. P.; 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.

SIMÕES, L. N. 2009. **A eficácia do óleo de cravo como anestésico em tilápias do nilo** (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado) – Universidade de Vila Velha, Vila Velha - ES.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n. 3, p.613-620, 2009.

SLADKY, K.K.; SWANSON, C.R.; STOSKOPF, M.K.; LOOMIS, M.R.; LEWBART, G.A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.337-342, 2001.

SNEDDON, L. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. **Brain Research Reviews**, v.46, p.123-130, 2004.

SOIVIO, A.; NYHOLM, K.; HUHTI, M. Effects of anaesthesia with MS222, neutralized MS222 and benzocaine on the blood constituents of Rainbow trout. **Journal of Fisheries and Biology**, v.10, n.1, p.91-101, 1977.

SOIVIO, A.; NYHOLM, K.; HUHTI, M. Effects of anesthesia with MS-222, neutralized MS-222 and benzocaine on the blood constituents of Rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.10, n.1, p.91-101, 1977.

Son, M. H.; Park, M. W.; Myeong, J. I.; Kim, D. J.; Kim, B. H.; Jo, Q. T.; Jeon, I. G. Anaesthetic tolerance of juvenile black rockfish *Sebastes schlegeli*, produced for wild stock enhancement. **Ocean and Polar Research**, v.23, p.285-290, 2001.

SPRAY, D. C. Cutaneous receptors: pain and temperature receptors of anurans. In: Llinas, R. e Precht, W. (Ed.). **Frog neurobiology: a handbook**. Berlin: Springer-Verlag, 1976, p.607-628.

STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A natural history of amphibians**. New Jersey: Princeton University Press, 1995. 316p.

STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/ sedative for public aquaculture in the United States. **Aquaculture Research**, v.30, n.5, p.365-372, 1999.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposure. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.21, p.121-127, 1998.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.5, p.387-392, 2000.

STEVENS, C. W. Opioid antinociception in amphibians. **Brain Reserch Bulletin**, v.21, p.959-962, 1988.

STEVENS, C. W. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. **Brain Research Reviews**, v.46, p.204-215, 2004.

STEVENS, C. W. Relative analgesic potency of mu, delta and kappa opioids after spinal administration in amphibians. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.276, p.440-448, 1996.

STEVENS, C. W.; PAUL, D. Opioid analgesia after spinal administration in amphibians: binding and behavioral studies. In: PROBLEMS OF DRUG DEPENDENCE 1995: PROCEEDINGS OF THE 57TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, **NIDA Research Monograph** 162, 1996, p. 222-225. Disponível em: <<http://archives.drugabuse.gov/pdf/Monographs/Download162.html>>. Acesso em: 15 set. 2010.

STEVENS, C. W.; WILLENBRING, S. Pain sensation and analgesia in amphibians and reptiles. In: Ackerman, L. (Ed.) **The biology, husbandry and health care of reptiles and amphibians**. Volume I, II e III. New Jersey: TFH Publications, 1997. p. 309-324.

STEVENS, C.W.; SANGHA, S.; OGG, B. G. Analgesia produced by immobilization stress and enkephalinase-inhibitor in amphibians. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.51, p.675-680, 1995.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 3.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1977. 534p.

SUMMERFELT RC, SMITH LS. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: Schreck, C.B; Moyle, P.B. (Ed.). **Methods for Fishery Biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1990. p.213-272.

SZOKE, A.; HAYTON, W. L.; SCHULTZ, I. R. Quantification of benzocaine and its metabolites in channel catfish tissues and fluids by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.16, p.69-75, 1997.

TAKAMURA, A. E.; RIBEIRO FILHO, O. P.; MARQUES, B. G. S. P.; CASTRO, M. V. G. R. P. Uso de diferentes concentrações de benzocaína e eugenol para sedação e insensibilização de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). In: SIMPÓSIOS DA UFV. **Anais...** XIX de Iniciação Científica – SIC; IX Mostra Científica da pós-graduação – SIMPÓS; VII de Extensão Universitária - SEU e III de Ensino – Sen, 2009.

TAKASHIMA, Y.; WAN, Z.; KASAI, H.; ASAKAWA, O. Sustained anesthesia with 2-phenoxyethanol in yearling rainbow trout. **Journal of Tokyo University of Fisheries**, v.69, n. 2, p.93–96, 1983.

TANIGUSHI, Y.; HISATOMI, O.; YOSHIDA, M.; TOKUNAGA, F. Pinopsin expressed in the retinal photoreceptors of a diurnal gecko. **FEBS Letters**, v.496, p.69-74, 2001.

TAVARES, M. L.; FORTUNATO, J. M. S.; MOREIRA, A. F. L. Stress – Respostas fisiológicas e patológicas. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v.2, n.002, p. 51-65, 2000.

TIRILLINI, B.; VELASQUEZ, E. R.; PELLEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Planta Medicine**, v.62, p.372-373, 1996.

TONON, M. C.; CUET, P.; LAMAEZ, M.; JEGOU, S.; COTE, J.; GOUTEAUX, L.; LING, N.; PELLETIER, G.; VAUDRY, H. Comparative effects of corticotrophin-release factor, arginine vasopressin, and related neuropeptides on the secretion of ACTH and alfa-MSH by frog anterior pituitary cells and neurointermediate lobes in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v.61, p.438-445, 1986.

TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADROS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, p. 907-910, 2002.

TOSINI, G.; BERTOLUCCI, C.; FOA, A. The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. **Physiology and Behaviour**, v.72, n.4, p.461-71, 2001.

TOSINI, G.; MENAKER, M. 1998. Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. **Journal of Neuroscience**, v.18, n.3, p.1105-14, 1998.

TOSINI, G.; MENAKER, M. Circadian rhythm of body temperature in an ectotherm (*Iguana iguana*). **Journal of Biology Rhythms**, v.10, n.3, p.248-55, 1995.

TOSINI, G.; MENAKER, M. The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. **Journal of Comparative Physiology - Sensory, neural, and behavioral physiology**, v.179, n.1, p.135-42, 1996.

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.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v.53, p.865-871, 2002.

TSUZUKI, K.; XING, H.; LING, J.; GU, J. G. Menthol induced Ca^{2+} release from presynaptic Ca^{2+} stores potentiates sensory synaptic transmission. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.3, p.762-771, 2004.

UCHIYAMA, M.; IWASAKI, S. T.; MURAKAMI, T. Surface and subsurface structures of neuromasts in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. **Journal of Morphology**, v.207, p.157-164, 1991.

UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promoting effects of peppermint oil and identification of its active constituents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.69, p.383-390, 2001.

VALENTE, C. O. **Uso de três anestésicos pelo método de aspersão branquial em adultos de peixes de produção**. 79p. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

VELASCO-SANTAMARIA, Y.; PALACIOS-RUIZ, C.; CRUZ-CASALLAS, P. Eficiência anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína quinaldina y metanosulfonato de tricaina em alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). **Revista MVZ Córdoba**, v.13, n.3, p. 1435-1445, 2008.

VIANA, F.; de la PENA, E.; BELMONT, C. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. **Nature Neuroscience**, v.5, p.254-260, 2002.

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**, Brasília, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; DE MACÊDO, G.R. Utilização do Eugenol como Anestésico para o Manejo de Juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.28, n.3, p. 275 - 279, 2006.

VIDAL, L. V. O; FURUYA, W. M.; GRACIANO, T. S.; SCHAMBER, C. R; SILVA, L. C. R; SANTOS, L. D.; SOUZA, S. R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p. 335-342, 2007a.

VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T. S.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D.; SOARES, C.M. Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.29, n.4, p.357-362, 2007b.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; SANTOS NETO, E. B.; DEUS, B. T.; ALBINATI, A. C. L. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p.212-216, 2007c.

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

VOET, D. I.; VOET, J. G. I.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. São Paulo: Artmed. 2000. p.229.

vS. HOFF, K.; BLAUSTEIN, A. R.; MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. Behavior: Interactions and their consequences. In: McDiarmid, R. W e Ronald, A. (Ed.).

Tadpoles: The biology of anuran larvae. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. p. 215- 239.

WARDLE, C. S. The changes in blood glucose in *Pleuronectes platessa* following capture from the wild: a stress reaction. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.52, n.3, p.635-651, 1972.

WATERSTRAT, P. R. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **Journal of World Aquaculture Society**, v.30, n.2, p.250-255, 1999.

WATT, E. E.; BETTS, B. A.; KOTEY, F. O.; HUMBERT, D. J.; GRIFFITH, T. N.; KELLY, E. W.; VENESKEY, K. C.; GILL, N.; ROWAN, K. C. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v.590, p.120-126, 2008.

WENDELLAR BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

WEVER, E. G. The ear and hearing in the frog, *Rana pipiens*. **Journal of Morphology**, v.141, p.461-477, 1973.

WIE, M. B.; WON, M. H.; LEE, K. H.; SHIN, J. H.; LEE, J. C.; SUH, H. W.; SONG, D. K.; KIM, Y. H. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. **Neuroscience Letters**, v.225, p.93-96, 1997.

WILLENBRING, S.; STEVENS, C. W. Spinal μ , δ e κ opioids alter chemical, mechanical and thermal sensitivities in amphibians. **Life Science**, v.61, n.22, p.2167-2176, 1997.

WILLENBRING, S.; STEVENS, C. W. Thermal, mechanical and chemical peripheral sensation in amphibians: opioid and adrenergic effects. **Life Science**, v.58, n.2, p.125-136, 1996.

WILSON, E. O. A situação atual da diversidade biológica. In: **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 657p.

WILT, F. H. The differentiation of visual pigments in metamorphosing larvae of *Rana catesbeiana*. **Developmental Biology**, v.1, n.2, p.199-233, 1959.

WILTSCSKO, W.; WILTSCSKO, R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. **Journal of Comparative and Physiology - Sensory, neural, and behavioral physiology**, v.191, p.675–693, 2005.

WINGFIELD, J. C., SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.711–724, 2003.

WINGFIELD, J. C.; MANEY, D. L.; BREUNER, C. W.; JACOBS, J. D.; LYNN, S.; RAMENOFISKY, M.; RICHARDSON., R. D. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage.” **American Zoologist**, v.38, p.191–206, 1998.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and resistance to stress: When and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 8, p. 711-724, 2003.

WINGFIELD, J.C.; MANEY, D.L.; BREUNER, C.W.; JACOBS, J.D.; LYNN, S.; RAMENOFISKY, M.; RICHARDSON, R.D. Ecological bases of hormone–behavior interactions: the “emergency life history stage”. **American Zoologist**, v.38, p.191–206, 1998.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.340-347, 2002.

Wright, M. R. The lateral line system of sense organs. **Quarterly Review of Biology**, v.26, p.264–280, 1951.

YAMASHITA, Y.; OGAWA, H. Slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units associated with Merkel cells in frog and effects of direct currents. Somatosens. **Motor Research**, v.8, p.87-95, 1991.

YANG, B. H.; PIAO, Z. G.; KIM, Y. B.; LEE, C. H.; LEE, J. K.; PARK, J. S.; KIM, J. S.; OH, S. B. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dentistry Research**, v.82, n.10, p.781-785, 2003.

Yoshikawa, T.; Okano, T.; Oishi, T.; Fukada, Y. A deep brain photoreceptive molecule in the toad hypothalamus. **FEBS Letters**, v.424, p.69-72, 1998.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Effects of pres-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v.295, p.52-59, 2009.

ZERANI, M.; GOBBETTI, A. ; POLZONETTI-MAGNI, A. In vitro steroid production by follicles of frog *Rana esculenta*: mammalian gonadotropin-releasing hormone effects. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.142, p.495–501, 1991.

ZUWALA K; KATO, S.; JAKUBOWSKI, M. Two generations of the tongue and gustatory organs in the development of *Hynobius dunni* Tago. **Journal of Anatomy**, v.201, p.91-97, 2002.

ZUWALA, K.; JAKUBOWSKI, M. Development of taste organs in *Rana temporaria*: transmission and scanning electron microscopic study. **Anatomy and Embryology**, v.184, p.363–369, 1991.

ZUWALA, K.; JAKUBOWSKI, M. Taste organs in the development of *Bufo bufo* tadpoles. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Zoology**, v.39, p.87–93, 1997.

ZUWALA, K. The development of the tongue and morphological and cytological changes in taste discs of *Rana esculenta*. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, v.34, p.17–25, 2002a.

ZUWALA, K. Ultrastructure of premetamorphic taste organs of the *Bombina variegata*. **Annals Academy Medicine**, v.42, p.204–207, 1997.

ZUWALA, K.. Development of the tongue and taste disks in *Pelobates fuscus*. **Folia Biologica**, v.50, p.165-172, 2002b.