

RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS EM TUVIRA APÓS ANESTESIA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DE CRAVO

Santiago Benites de PÁDUA ¹; Arlene Sobrinho VENTURA ²; Fabiana SATAKE ³; Márcia Mayumi ISHIKAWA ⁴; Hamilton HISANO ⁵; Marco Aurélio ROTTA ⁶; Flávio Cese ARANTES ⁷

RESUMO

Este estudo avaliou a resposta hematológica de tuvira (*Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*) após a anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. Foram utilizados 25 indivíduos com comprimento médio de 26,8 ± 2,4 cm e peso médio de 94,4 ± 23,6 g. Os animais foram separados em cinco grupos, compostos por cinco animais cada, e submetidos individualmente às concentrações de óleo de cravo avaliadas: 40, 80, 120, 160 e 200 mg L⁻¹. Após a recuperação anestésica, procedeu-se a colheita sanguínea e realização do hemograma completo. Os resultados foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey ($P < 0,05$) e correlação de Sperman. Foi observado aumento ($P < 0,05$) no percentual de hematócrito, número de eritrócitos, número de trombócitos e nos valores de neutrófilos, na medida em que se elevou a concentração de óleo de cravo. Em adição, foi observada correlação negativa ($P < 0,05$) para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e correlação positiva nos valores de monócitos e neutrófilos ($P < 0,01$). A anestesia com óleo de cravo em tuvira ocasiona alterações no hemograma, com efeito dose-dependente. Estas alterações devem ser consideradas, principalmente em estudos futuros, com propósito de estabelecer os valores de referência para as variáveis hematológicas desta espécie.

Palavras chave: Anestésico alternativo; eugenol; hematologia de peixes; isca-viva; *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*

HEMATOLOGICAL RESPONSES IN TUVIRA AFTER CLOVE OIL ANESTHESIA AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

ABSTRACT

The hematological responses in tuvira (*Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*) after clove oil anesthesia at different concentrations were evaluated in this study. Fish ($n = 25$) with average length of 26.8 ± 2.4 cm and weighing 94.4 ± 23.6 g were separated in five groups composed with five animals each and submitted individually to respective concentrations of clove oil: 40, 80, 120, 160 and 200 mg L⁻¹. After anesthetic recuperation, the blood samples collection were performed, as well as complete hemogram. The results were submitted to analysis of variance, Tukey test ($P < 0.05$) and Sperman's correlation analysis. There was an increase ($P < 0.05$) on hematocrit, red blood cells count, thrombocytes count and in the values of neutrophils with increasing of clove oil concentrations. In addition, positive correlation ($P < 0.05$) were observed on total leukocytes, as well as negative linear correlation ($P < 0.05$) for mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The clove oil anesthesia on tuvira cause hematological changes with an effect dose-dependent. These changes should be considered mainly in future studies designed to establish the reference values of hematologic variables for this specie.

Key words: Alternative anesthetic; eugenol; fish hematology; live bait; *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus*

Artigo Científico: Recebido em 18/02/2012 – Aprovado em 22/07/2012

¹ Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal (CAUNESP). Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n – CEP: 14.870-000 – Jaboticabal – SP – Brasil. e-mail: santiagopadua@live.com (autor correspondente)

² Faculdade Anhanguera de Dourados. Rua Manoel Santiago, 1.775 – Vila São Luis – CEP: 79.925-150 – Dourados – MS – Brasil. e-mail: arlene_s_sobrinho@hotmail.com

³ Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). CEP: 58.397-000 – Areia – PB – Brasil. e-mail: fabiana@cca.ufpb.br

⁴ Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6 – Caixa Postal 449 – CEP: 79.804-970 – Dourados – MS – Brasil. e-mail: marcia@cpao.embrapa.br

⁵ Embrapa Agropecuária Oeste. e-mail: hhisano@cpao.embrapa.br

⁶ Embrapa Clima Temperado, BR 392, km 78 – Caixa Postal 403 – CEP: 96.010-971 – Pelotas – RS – Brasil. e-mail: rotta.marco@cpact.embrapa.br

⁷ Departamento de Ciências Exatas, Unesp de Jaboticabal. Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n – CEP: 14.870-000 – Jaboticabal – SP – Brasil. e-mail: flavionex@hotmail.com

* Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo n. 005/2011 – CEUA/UFGD)

INTRODUÇÃO

Algumas espécies de peixes pertencentes ao gênero *Gymnotus*, conhecidos popularmente como tuvira, sarapó, peixe espada, carapó e ituí, possuem grande importância econômica na região do Pantanal devido à exploração como iscas-vivas. A estimativa de captura no estado de Mato Grosso do Sul é cerca de 15 milhões de iscas ao ano, onde a tuvira é considerada a isca-viva capturada e comercializada em maior quantidade (MORAES e ESPINOZA, 2001).

Estes peixes não possuem hábito agressivo, entretanto, seu manejo e contenção mecânica são dificultados devido ao muco protetor e peculiaridades anatômicas. Dessa forma, o uso de fármacos anestésicos torna-se imprescindível para sua manipulação. A utilização de anestésicos em peixes é realizada visando mitigar e ou atenuar os efeitos do estresse agudo ocasionado durante a manipulação sem anestesia, bem como zelar pela integridade dos peixes. Os anestésicos também têm sido empregados em procedimentos de colheita sanguínea, visto que existem evidências de que os peixes possuem sistema nociceptivo com similaridades aos demais vertebrados (SNEDDON, 2004).

Embora existam vários estudos com anestésicos em espécies nativas brasileiras (INOUE *et al.*, 2004, 2005; FAÇANHA e GOMES, 2005; ROUBACH *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; HISANO *et al.*, 2008; PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; PÁDUA *et al.*, 2010), até então, a utilização de anestésicos em peixes no Brasil não se encontra regulamentada. O óleo de cravo, por sua vez, é um anestésico natural, composto principalmente pela mistura de eugenol, metileugenol e isoeugenol. Este anestésico tem sido amplamente utilizado no manejo de campo em pisciculturas brasileiras, especialmente em procedimentos de vacinações, manejo de reprodutores, transporte de peixes agressivos como o dourado (*Salminus brasiliensis*), bem como em pesquisas, embora seja um fármaco não recomendado pelo *Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine* (FDA/CVM, 2007). Associado a esta condição, poucos estudos abordam a resposta fisiológica dos peixes quando expostos aos

anestésicos, o que torna incerto seus efeitos sobre estes animais.

Alterações no percentual de hematócrito, bioquímica sérica e eletrólitos plasmáticos foram descritos em matrinxã (*Brycon amazonicus*) anestesiados com benzocaína e 2-fenoxietanol (INOUE *et al.*, 2004). No ciprinídeo *Rutilus rutilus* foram descritas alterações no eritrograma com efeito dose-dependente quando anestesiados com diferentes concentrações de cravo em pó (SUDAGARA *et al.*, 2009). Por outro lado, em carpa comum não foram observadas alterações no hemograma quando anestesiadas com óleo de cravo (VELISEK *et al.*, 2005).

Dessa forma, no presente estudo, avaliou-se a resposta hematológica de tuvira (*Gymnossus aff. inaequilabiatus*) após a anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta indivíduos de tujurinas foram adquiridos por meio de "isqueiros" na região do Pantanal Corumbaense (18°04'15,00"S; 57°28'17,00"O) no mês de setembro de 2008. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste, localizada no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, onde foram aclimatados em tanques circulares de fibra de vidro com capacidade de 1.000 L, abastecidos com fluxo contínuo de água proveniente de poço artesiano (10 L min⁻¹), e treinados a receberem alimentação exógena artificial extrusada.

Durante o período de condicionamento alimentar, foi ofertada ração comercial para peixes carnívoros (45% PB, 14% extrato etéreo, 6% matéria fibrosa, 14% extrato mineral, 1% fósforo e 2,5% de cálcio) após prévia moagem e confecção de *pellets* úmidos. Estes foram mantidos em geladeira (5 - 7 °C) e fornecidos duas vezes ao dia (7:30h e 16:30h) durante um período de três meses. Após esta etapa, iniciou-se a oferta desta mesma ração, no entanto, sem o processamento adicional.

A temperatura da água e o nível de oxigênio dissolvido foram medidos diariamente utilizando aparelho multiparâmetro digital (YSI® 55, Incorporated, Yellow Spring, EUA). Os valores

médios \pm desvio padrão para estes parâmetros foram: oxigênio dissolvido $5,3 \pm 0,2$ mg L⁻¹ e temperatura $25,2 \pm 0,8$ °C, permanecendo dentro da faixa de conforto para a espécie. Diariamente foi realizada a limpeza do tanque por meio de sifonagem, para a retirada de eventuais resíduos orgânicos (fezes e sobras de ração).

Após um ano de aclimação em condições laboratoriais, 25 peixes aparentemente saudáveis e sem lesões superficiais, medindo $26,8 \pm 2,4$ cm e pesando $94,4 \pm 23,6$ g, foram utilizados para indução anestésica com óleo de cravo. Para isso, foi preparada uma solução alcoólica estoque contendo álcool etílico (PA 95%) e óleo de cravo comercial em diluição de 1:20 (v/v), sendo este produto obtido em farmácia de manipulação.

Os peixes foram separados em cinco grupos, compostos por cinco animais, sendo então submetidos individualmente às concentrações de óleo de cravo avaliadas: 40, 80, 120, 160 e 200 mg L⁻¹. Foram utilizados dois recipientes plásticos com volume de 20 L para indução anestésica, sendo utilizada água dos tanques de aclimação e renovada em cada teste, com intuito de evitar possíveis concentrações residuais. A observação dos estágios de indução anestésica e de recuperação foi baseada em critérios estabelecidos por WOODY *et al.* (2002). Para recuperação anestésica, os indivíduos foram alojados em recipiente plástico de mesmo volume, com aeração constante.

Após completa recuperação anestésica (momento em que os indivíduos restabelecem o equilíbrio corporal e começam a nadar horizontalmente), os peixes foram capturados com auxílio de puçá e contidos mecanicamente com pano umedecido. Em seguida, procedeu-se a venopunção caudal por meio de seringa descartável (3 mL) e agulha hipodérmica (25 x 7 mm), previamente banhadas com EDTA 3%. O sangue foi acondicionado em microtubos de polipropileno, com capacidade de 1,5 mL, e mantidos sob refrigeração (5 - 7 °C) até o momento do processamento das amostras (entre 60 e 90 minutos).

Imediatamente após colheita sanguínea, foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicatas utilizando o sangue remanescente na agulha para posterior coloração pancrômica

com May Grünwald-Giemsa-Wright. Estas extensões sanguíneas foram utilizadas para contagem diferencial de leucócitos, bem como para leucometria e trombometria global utilizando método indireto (TAVARES-DIAS e MORAES, 2006).

A partir das amostras sanguíneas, foi determinado o percentual do hematócrito, pelo método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971); utilizando o plasma remanescente do microtubo de hematócrito, foi determinado o teor de proteínas plasmáticas totais (PPT) por meio de refratometria, com auxílio de refratômetro portátil. Foi realizada a contagem de eritrócitos após diluição do sangue previamente homogeneizado em solução formol-citrato (1:200) e contagem realizada em hemocítmetro. Para determinação da concentração de hemoglobina, foi utilizado o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). De posse desses dados, foram calculados os índices hematimétricos de WINTROBE (1934), compreendidos pelo Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Foi adotado delineamento inteiramente casualizado (DIC), contendo cinco tratamentos com cinco repetições (peixe). Os resultados dos parâmetros hematológicos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em adição, foram realizadas análises de correlação de Spearman com os parâmetros hematológicos nas diferentes concentrações de óleo de cravo avaliadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software Statistica 7 (StatSoft).

RESULTADOS

A anestesia com concentrações crescentes de óleo de cravo em tucunaré ocasionou aumento ($P < 0,05$) no percentual de hematócrito e no número de eritrócitos. Na taxa de hemoglobina, VCM, CHCM e PPT não foram observadas alterações significativas nos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Os valores referentes ao trombograma e leucograma estão relacionados na Tabela 2. Na

contagem de trombócitos foi observado aumento nos valores ($P<0,05$) nas duas concentrações maiores. Em adição, foi

observado incremento ($P<0,05$) nos valores de neutrófilos na concentração de 200 mg L⁻¹ de óleo de cravo.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão do eritrograma e teor de proteínas plasmáticas totais (PPT) em tuvira após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo.

Parâmetros	Óleo de cravo				
	40 mg L ⁻¹	80 mg L ⁻¹	120 mg L ⁻¹	160 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹
Hematócrito (%)	35,4 \pm 2,2 ^b	38,0 \pm 2,7 ^{ab}	35,8 \pm 3,0 ^b	40,0 \pm 3,6 ^{ab}	41,8 \pm 2,7 ^a
Eritrócitos (x 10 ⁶ μ L ⁻¹)	2,0 \pm 0,2 ^b	2,2 \pm 0,1 ^{ab}	2,0 \pm 0,2 ^b	2,3 \pm 0,2 ^a	2,4 \pm 0,1 ^a
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	9,0 \pm 0,8	8,8 \pm 0,7	8,3 \pm 1,3	9,2 \pm 1,2	9,4 \pm 1,5
VCM (fL)	173,6 \pm 5,8	168,2 \pm 9,2	175,7 \pm 7,3	172,2 \pm 9,9	173,8 \pm 4,3
CHCM (g dL ⁻¹)	25,5 \pm 1,4	23,1 \pm 0,5	23,2 \pm 2,0	22,9 \pm 1,2	22,4 \pm 2,3
PPT (g dL ⁻¹)	5,8 \pm 0,5	5,4 \pm 0,6	5,8 \pm 0,7	5,5 \pm 0,5	5,4 \pm 0,9

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P<0,05$).

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão do trombograma e leucograma em tuvira após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo.

Parâmetros	Óleo de cravo				
	40 mg L ⁻¹	80 mg L ⁻¹	120 mg L ⁻¹	160 mg L ⁻¹	200 mg L ⁻¹
Trombócitos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	17,9 \pm 4,1 ^b	31,8 \pm 4,4 ^{ab}	28,6 \pm 8,2 ^{ab}	42,7 \pm 10,6 ^a	45,1 \pm 14,4 ^a
Leucócitos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	21,9 \pm 12,5	23,3 \pm 15,7	29,8 \pm 14,3	35,9 \pm 15,6	31,7 \pm 6,7
Linfócitos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	17,6 \pm 11,3	15,4 \pm 10,9	22,9 \pm 16,2	23,4 \pm 15,3	16,5 \pm 1,9
Monócitos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	0,5 \pm 0,5	0,7 \pm 0,7	1,6 \pm 1,3	2,6 \pm 2,4	2,4 \pm 1,0
Neutrófilos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	2,7 \pm 1,3 ^b	6,3 \pm 6,0 ^{ab}	4,1 \pm 1,5 ^{ab}	7,5 \pm 4,5 ^{ab}	10,9 \pm 5,3 ^a
Basófilos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	0,8 \pm 0,8	0,8 \pm 0,4	0,9 \pm 0,9	2,2 \pm 3,6	1,4 \pm 2,0
Eosinófilos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	22,8 \pm 50,9	0	0,1 \pm 0,1	0	0,1 \pm 0,1
Leucócitos imaturos (x 10 ³ μ L ⁻¹)	0,2 \pm 0,2	82,4 \pm 127,6	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3

Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P<0,05$).

Na análise de correlação de Sperman (Figura 1), verificou-se efeito positivo ($P<0,01$) no percentual de hematócrito, número de eritrócitos, nos valores de monócitos e neutrófilos ($P<0,01$) e no trombograma

($P<0,0001$), conforme o aumento das concentrações de óleo de cravo. Correlação negativa ($P<0,05$) foi observada somente para CHCM. Não foi observada correlação ($P>0,05$) nos demais parâmetros avaliados.

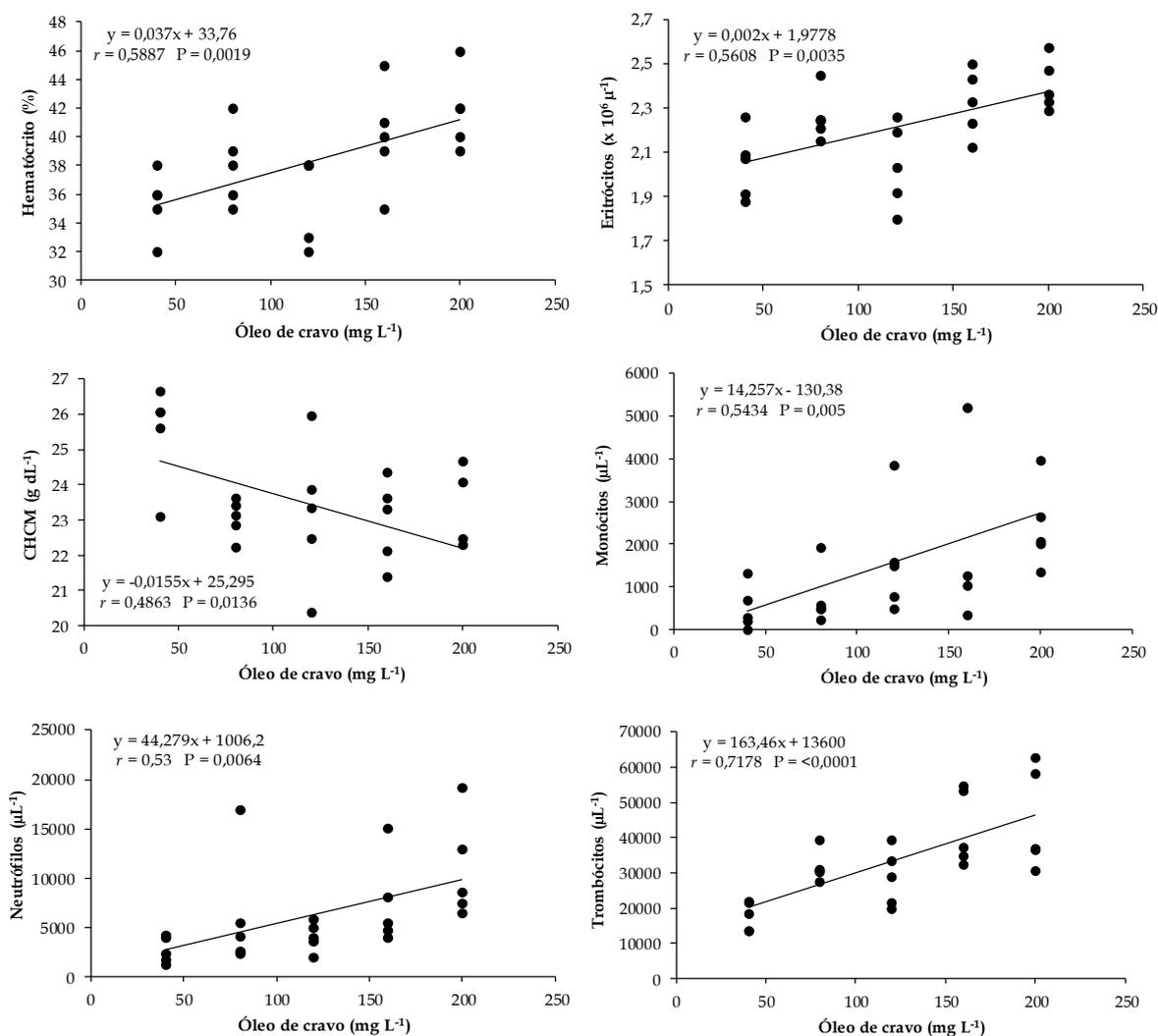


Figura 1. Correlação de Spearman entre os parâmetros hematológicos de tuiara após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo.

DISCUSSÃO

SUDAGARA *et al.* (2009), de forma similar ao presente estudo, verificaram aumento nos valores de hematócrito e eritrócitos em *R. rutilus* anestesiados com concentrações crescentes de cravo em pó (175, 225, 275 e 350 mg L⁻¹). MOHAMMADIZAREJABAD *et al.* (2010) descreveram efeito similar no esturjão (*Huso huso*) ao avaliar essas mesmas concentrações deste anestésico. A anestesia com cravo em pó ocasionou o aumento nas concentrações de hemoglobina, com efeito dose-dependente, nas duas espécies avaliadas (SUDAGARA *et al.*, 2009; MOHAMMADIZAREJABAD *et al.*, 2010). Por outro lado, no presente estudo com a tuiara, não

foram observadas alterações na taxa de hemoglobina, mas houve diminuição da CHCM.

INOUE *et al.* (2004), ao avaliarem diferentes concentrações de 2-fenoxietanol e benzocaína durante o manejo de matrinxã, corroboram o aumento do percentual de hematócrito de acordo com maiores doses dos fármacos. Resultados semelhantes foram obtidos por VELISEK *et al.*, (2007a) ao avaliarem a concentração de 0,30 ml L⁻¹ de 2-fenoxietanol em *Silurus glanis*. Os mesmos autores ainda observaram aumento do VCM após 10 min de anestesia, o que não se observou no presente estudo. Por outro lado, VELISEK *et al.* (2005) não observaram alterações significativas nos parâmetros eritrométricos de carpa comum

após 10 min de anestesia com 30 mg L⁻¹ de óleo de cravo; entretanto, na bioquímica sérica foi reportado aumento na glicemia e no teor de fosfato inorgânico nos peixes submetidos a este anestésico. VELISEK *et al.* (2007b), em estudo realizado com carpa comum e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando 0,30 mL L⁻¹ de 2-fenoxietanol, também não observaram alterações significativas no eritrograma. Essas diferenças revelam influência espécie-específica, no entanto, peculiaridades relacionadas à farmacocinética de cada anestésico devem ser consideradas.

BOLASINA (2006), ao avaliar o efeito da anestesia com 40 mg L⁻¹ de benzocaína em *Urophycis brasiliensis*, observaram tendência de aumento no número de trombócitos no grupo anestesiado, no entanto, não significativo na análise estatística empregada. VELISEK *et al.* (2005) não observaram alterações no leucograma de carpa comum anestesiadas com 30 mg L⁻¹ de óleo de cravo. SUDAGARA *et al.* (2009) também não verificaram alterações na série branca de *R. rutilus* anestesiados com diferentes concentrações de pó de cravo. A anestesia com 0,30 mL L⁻¹ de 2-fenoxietanol em *S. glanis* (VELISEK *et al.*, 2007a), assim como em truta arco-íris e carpa comum (VELISEK *et al.*, 2007b), não ocasionaram alterações nos valores de leucócitos.

O incremento nas variáveis hematológicas (séria vermelha e branca) de tuvira neste estudo possivelmente pode ter sido resultante da ação de catecolaminas (liberadas pela ativação do eixo hipotálamo - sistema nervoso simpático - células cromafins), que determinam a contração esplênica em resposta ao estímulo de estresse agudo, ocasionado pelas altas doses de anestésico, como proposto por INOUE *et al.* (2004). Além disso, a ação de glicocorticóides endógenos (liberados pela ativação do eixo hipotálamo - hipófise - interrenal) nestas situações pode ocasionar maior influxo de neutrófilos oriundos dos órgãos leucopoiéticos para o sangue circulante, bem como restringir sua migração para outros tecidos (DAVIS *et al.*, 2008), o que determina seu aumento na circulação sanguínea. Embora ainda não elucidado em peixes, o aumento de trombócitos em tuvira neste estudo pode ser devido a mecanismos similares a estes, que ocasionam o aumento de neutrófilos, uma vez que esta célula

de defesa orgânica possui habilidade de migração para outros tecidos em peixes teleósteos como parte da resposta inflamatória (MARTINS *et al.*, 2008).

O efeito estressor ocasionado por anestésicos tem sido relatado em algumas espécies de peixes, como observado em matrinxã submetido a diferentes concentrações de benzocaína (CARNEIRO *et al.*, 2002) e óleo de cravo (INOUE *et al.*, 2005) durante o transporte, bem como em *U. brasiliensis* anestesiados com 40 mg L⁻¹ de benzocaína (BOLASINA, 2006), constatado pelo aumento concomitante das concentrações plasmáticas de glicose e cortisol. No entanto, deve-se considerar que em espécies como o matrinxã, a não utilização de anestesia ocasiona respostas mais pronunciadas quando submetidas ao estímulo de estresse (INOUE *et al.*, 2005).

Em adição, o incremento nos níveis de hematócrito e eritrócitos observados neste estudo podem estar relacionados ao mecanismo compensatório frente à hipóxia tecidual ocasionada em condições de anestesia, visto que os anestésicos ocasionam déficit respiratório pela diminuição dos batimentos operculares. Além disso, ocorre hipoperfusão periférica devido à diminuição do débito cardíaco, além de possíveis alterações na pressão arterial e dilatação de vasos periféricos. Estes efeitos fazem parte da farmacodinâmica de cada anestésico, e a intensidade e gravidade de cada alteração depende do mecanismo de ação de cada grupo farmacológico. O mecanismo fisiológico de compensação frente à hipoxia resulta em liberação das células estocadas nos centros hematopoiéticos e, muitas vezes, estas células não estão totalmente maduras. Dessa forma, a diminuição da CHCM neste estudo deve-se à liberação de eritroblastos (eritrócitos imaturos), visto que a biosíntese de hemoglobina encontra-se ativa nestas células, possuindo baixa concentração deste pigmento respiratório (SATAKE *et al.*, 2009).

CONCLUSÕES

A anestesia com óleo de cravo em tuvira ocasiona alterações no hemograma, com efeito dose-dependente. Estas alterações devem ser consideradas, principalmente em estudos futuros, com propósito de estabelecer os valores

de referência para as variáveis hematológicas desta espécie.

REFERÊNCIAS

- BOLASINA, S.N. 2006 Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, London, 14(6): 569-575.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATH, E.C.; MARTINS, M.L. 2002 Transport with benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Oseichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, Maringá, 24(2): 555-560.
- COLLIER, H.B. 1944 The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, 50(6): 550-552.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. 2008 The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, Oxford, 22(5): 760-772.
- FAÇANHA, M.F. e GOMES, L.C. 2005 A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Amazonica*, Manaus, 35(1): 71-75.
- FDA/CVM - Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine. 2007 *Guidance for industry: concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish*. Rockville. 3p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052520.pdf>> Acesso em: 17 jun. 2012.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, 56(1): 35-39.
- GONÇALVES, A.F.N.; SANTOS, E.C.C.; FERNANDES, J.D.K.; TAKAHASHI, L.S. 2008 Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, Maringá, 30(3): 339-344.
- HISANO, H.; ISHIKAWA, M.M.; FERREIRA, R.A.; BULGARELLI, A.L.A.; COSTA, T.R.; PÁDUA, S.B. 2008 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*, Maringá, 30(3): 303-307.
- INOUE, L.A.K.A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. 2004 Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Biodiversidade Pampeana*, Uruguaiana, 2(1): 10-15.
- INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, Manaus, 35(2): 289-295.
- MARTINS, M.L.; MIYAZAKI, D.M.Y.; MORAES, F.R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W.B.; MOURIÑO, J.L.P. 2008 Suplementação com vitamina C e E influencia a resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38: 213-218.
- MORAES, A.S.; ESPINOSA, L.W. 2001 *Captura e a comercialização de iscas vivas em Corumbá-MS*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 37p. (Embrapa Pantanal. Boletim de Pesquisa, 21).
- MOHAMMADIZAREJABAD, A.; BASTAMI, K.D.; SUDAGAR, M.; MOTLAGH, S.P. 2010 Haematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to clove powder as an anaesthetic. *Comparative Clinical Pathology*, London, 19: 465-468.
- PÁDUA, S.B.; PIETRO, P.S.; IGLESIAS-FILHO, P.S.; ISHIKAWA, M.M.; HISANO, H. 2010. Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 36(2): 143 - 148.
- PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R.; COPOLLA, M.P. 2009 Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(6): 1851-1856.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. 2005 Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum*

- (Cuvier). *Aquaculture Research*, Oxford, 36(11): 1056-1061.
- SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. 2009 Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. 1º ed. Macapá: Embrapa Amapá. p.330-345.
- SNEDDON, L.U. 2004 Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Reviews*, Amsterdam, 46: 123-130.
- SUDAGARA, M.; MOHAMMADIZAREJABADA, A.; MAZANDARANIA, R.; POORALIMOTLAGHA, S. 2009 The efficacy of clove powder as an anesthetic and its effects on hematological parameters on roach (*Rutilus rutilus*). *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, Faisalabad, 1(1): 1-5.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2006 Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica*, Mexico, 16: 271-274.
- VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. 2005 Effects of clove oil on aesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Medicine*, Bonner Springs, 50(6): 269-275.
- VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNY, L. 2007a Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *Veterinary Medicine*, Bonner Springs, 52(3): 103-110.
- VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V. 2007b Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on haematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, Brno, 76(3): 487-492.
- VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D.; MARTINS, C. 2007 Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piaçuçu (*Leporinus macrocephalus*). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, Maringá, 29(4): 357-362.
- WINTROBE, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig, 51: 32-49.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. 2002 Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trails. *Journal Fish Biology*, London, 60(2): 340-347.