

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

LAVINIA VERA DE SALVE

**INDUÇÃO ANESTÉSICA COM ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO E
EUGENOL EM LAMBARI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*):
ESTRESSE E QUALIDADE SEMINAL**

**CAMPO GRANDE – MATO GROSSO DO SUL
2025**

LAVINIA VERA DE SALVE

**INDUÇÃO ANESTÉSICA COM ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO E
EUGENOL EM LAMBARI-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax lacustris*):
ESTRESSE E QUALIDADE SEMINAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Zootecnia.

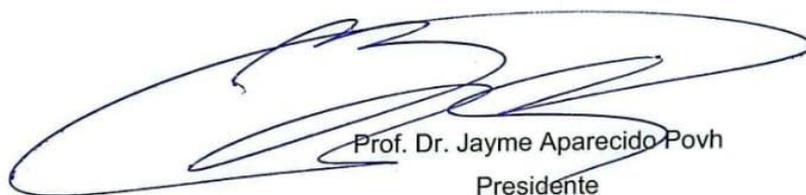
Orientador: Jayme Aparecido Povh

CAMPO GRANDE - MATO GROSSO DO SUL

2025

LAVINIA VERA DE SALVE

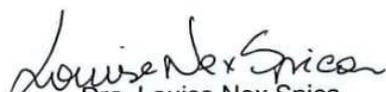
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em 04 de julho de
2025, e aprovado pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh
Presidente



Dra. Rebeca Maria Sousa
Membro da Banca



Dra. Louise Nex Spica
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, pela saúde, força e sabedoria concedidas durante toda minha trajetória acadêmica.

Aos meus familiares, pelo apoio, compreensão e suporte fornecidos, em especial aos meus avós José e Guilhermina que fizeram o possível para que a conclusão do curso fosse possível.

Agradeço em especial minhas amigas Chryslary, Leticia e Rafaela, por toda parceria e motivação, por estarem ao meu lado desde o início da graduação, sendo meus maiores apoios nos bons e maus momentos, celebrando as pequenas e grandes conquistas. Vocês são família, obrigada por toda amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jayme Povh, pela orientação, paciência e valiosas contribuições que foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A técnica da Estação Experimental de Piscicultura, Karina, por todo seu apoio emocional e amizade, que contribuíram grandemente para minha evolução como profissional e principalmente como pessoa.

Agradeço também aos professores e servidores do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial aos professores Dr. Ruy Alberto e Dra. Susana Amaral, por todo apoio fornecido em meio as dificuldades, além dos conhecimentos compartilhados que foram de suma importância para minha formação.

Ao Grupo de Pesquisa AQUIMS, pela contribuição para meu crescimento acadêmico no âmbito da piscicultura, e pela realização deste projeto. Agradeço em especial aos pós-graduandos Rebeca, Lucas, Louise, Yago e Francielly por toda sua paciência, colaboração, apoio, amizade e momentos de descontração, durante todo meu período de estágio.

A Família Barros de Deus, por me acolherem na reta final dessa trajetória, sendo um dos meus maiores apoios para concluir esta etapa, minha imensa gratidão por todo carinho.

Por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse Trabalho de Conclusão de Curso, deixo meu muito obrigada.

*“As dificuldades preparam pessoas
comuns para destinos extraordinários” -
C.S. Lewis*

RESUMO

O uso de óleos essenciais como anestésicos em peixes tem se tornado uma opção favorável para diminuir o impacto de agentes estressores no bem-estar e, conseqüentemente, no desempenho durante o manejo reprodutivo. Nesse sentido, embora esse procedimento possa minimizar o estresse e a mortalidade dos peixes, há poucas informações quanto ao efeito da anestesia na qualidade seminal dos peixes. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos anestésicos do óleo essencial de manjeriço e eugenol sobre o estresse fisiológico e a qualidade seminal de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*). 108 peixes (14,38 g) foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: (i) controle; (ii) óleo essencial de manjeriço e; (iii) eugenol. Foram utilizados aquários de 20 L como unidades experimentais com seis repetições para cada tratamento. Cada repetição consistia em um aquário com seis peixes. Os peixes foram induzidos com extrato de hipófise de carpa na posologia de 2,5 mg kg⁻¹ de peso vivo, em uma única aplicação. Após 220 horas-grau, realizou-se a coleta do sêmen, formando-se dois *pools* (réplicas) por aquário, cada um composto pelo sêmen de três peixes. Os resultados obtidos indicaram, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas características seminais e taxa de sobrevivência do lambari-do-rabo-amarelo após o uso dos anestésicos durante o manejo reprodutivo. Entretanto, observou-se que a glicose sanguínea dos peixes foi maior ($p < 0,05$) no grupo anestesiado com óleo essencial de manjeriço (75,54 mg dL⁻¹) seguido do eugenol (69,14 mg dL⁻¹) não diferindo significativamente ($p > 0,05$) dos peixes do grupo controle (61,46 mg dL⁻¹). A partir dos resultados encontrados, conclui-se que o uso do óleo essencial de manjeriço e eugenol, não foram capazes de mitigar os efeitos do estresse no lambari-do-rabo-amarelo durante manejo reprodutivo, mas foram eficientes em preservar a qualidade espermática.

Palavras-chave: *Astyanax lacustris*, características seminais, CASA, manejo reprodutivo, reprodução induzida.

ABSTRACT

The use of essential oils as anesthetics in fish has emerged as a promising strategy for reducing the impact of stressors on welfare and, consequently, performance during reproductive management. Therefore, although these procedures may help mitigate stress and mortality, there is little information regarding the effect of anesthesia on seminal quality. Therefore, this study aimed to evaluate the anesthetic effects of basil essential oil and eugenol on physiological stress and seminal quality in yellow-tailed lambari (*Astyanax lacustris*). One hundred and eight fish (14.38 g) were distributed in a completely randomized design with three treatments: (i) control; (ii) basil essential oil; and (iii) eugenol. Twenty-L aquariums were used as experimental units, with six replicates for each treatment. Each replicate consisted of one aquarium with six fish. The fish were induced with carp pituitary extract at a dosage of 2.5 mg kg⁻¹ of body weight, in a single application. After 220-degree hours, semen was collected, forming two pools (replicates) per aquarium, each composed of the semen of three fish. The results obtained indicated that there was no significant difference ($p > 0.05$) in the seminal characteristics and survival rate of the yellow-tailed lambari after the use of anesthetics during reproductive management. However, it was observed that the blood glucose of the fish was higher ($p < 0.05$) in the group anesthetized with basil essential oil (75.54 mg dL⁻¹) followed by eugenol (69.14 mg dL⁻¹) not differing significantly ($p > 0.05$) from the fish in the control group (61.46 mg dL⁻¹). From the results found, it is concluded that the use of basil essential oil and eugenol were not able to mitigate the effects of stress on the yellow-tailed lambari during reproductive management but were efficient in preserving sperm quality.

Keywords: *Astyanax lacustris*, seminal characteristics, CASA, reproductive management, induced reproduction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental, com os tratamentos: Controle, Óleo Essencial de Manjerição (OEM, 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e Eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$). Os aquários (5 L) representam a indução anestésica de acordo com cada tratamento. Após a coleta de sêmen, para a realização dos pools, os peixes foram submetidos a coleta de sangue para a avaliação da glicose sanguínea em glicosímetro portátil. 14
- Figura 2. Características quantitativas do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) após indução anestésica com óleo essencial de manjerição (OEM; 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$); não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p>0,05$). Sptz: espermatozoides. 18
- Figura 3 . Taxa de sobrevivência (%) de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) após indução anestésica com óleo essencial de manjerição (OEM; 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) após 24 horas do manejo reprodutivo; a variável taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p>0,05$). Qtd de peixes é o número de peixes em cada tratamento; mortalidade: total de peixes que morreram após 24 horas do manejo reprodutivo. 20
- Figura 4. Glicose sanguínea (mg dL^{-1}) em lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) submetidos a indução anestésica com óleo essencial de manjerição (OEM; 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) após o manejo reprodutivo de coleta de sêmen. Letras distintas ($p=0,0449$) indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis cinéticas de espermatozoides do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (<i>Astyanax lacustris</i>) após indução a anestesia com óleo essencial de manjerição (600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) em 10 segundos de avaliação pelo CASA.	19
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA	13
2.1. LOCAL E ANIMAIS	13
2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
2.3. INDUÇÃO HORMONAL E COLETA DE SÊMEN	14
2.4. VOLUME SEMINAL, ANÁLISE COMPUTADORIZADA ASSISTIDA (CASA), CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E PRODUÇÃO TOTAL DE ESPERMATOZOIDES	15
2.5. ANÁLISE HEMATOLÓGICA E SOBREVIVÊNCIA	16
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4. CONCLUSÃO	22
5. AGRADECIMENTOS.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

O avanço da piscicultura no Brasil está diretamente associado ao aprimoramento das técnicas de reprodução induzida em peixes, o que tem contribuído significativamente para o aumento da produtividade. No entanto, a eficiência reprodutiva desses animais é influenciada por uma série de fatores ambientais e fisiológicos, que ao serem manejados adequadamente, resultam em ovos, larvas, juvenis e adultos saudáveis (Mylonas et al., 2010). Entre as espécies de interesse para a aquicultura, destacam-se os peixes reofílicos, que apresentam comportamento migratório e dependem de estímulos naturais como variações no fotoperíodo, temperatura e aumento da pluviosidade para completar o ciclo reprodutivo (Andrade et al., 2003). Em ambientes controlados, como nas pisciculturas, a ausência desses estímulos compromete a ovulação e a desova nas fêmeas, e nos machos a espermiacção (Nunes et al., 2018), impossibilitando a reprodução.

O sucesso da reprodução em laboratórios de piscicultura de espécies reofílicas requer a adoção de processos de indução hormonal. No entanto, esse manejo pode ser altamente estressante para os peixes, podendo, em casos mais graves, levar à mortalidade. Assim, a adoção de práticas que minimizem o estresse durante os procedimentos de espermiacção e desova é fundamental para o sucesso reprodutivo e para o bem-estar animal (Nunes et al., 2018). Nesse contexto, o uso de anestésicos se apresenta como uma alternativa eficaz para reduzir os efeitos negativos do manejo reprodutivo. Esses anestésicos agem no metabolismo dos animais, permitindo a dessensibilização causada pela depressão do sistema nervoso central (Godoy et al., 2025). Tal forma de anestesia, pode ser administrada por meio da imersão do peixe em solução anestésica (Zanin et al., 2021). Estudos recentes têm utilizado derivados de plantas em substituição aos anestésicos sintéticos, a exemplo disso estão os óleos essenciais, sendo o mais utilizado o óleo de cravo, que tem como principal composto químico natural, o eugenol (Lins et al., 2025). Nascimento et al., (2020), demonstraram que apesar do uso frequente do eugenol como anestésico em peixes, este composto apresentou efeitos genotóxicos em lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*), tais efeitos referem-se aos danos causados ao material genético (DNA e cromossomos) por agentes químicos, físicos ou biológicos, podendo levar a mutações, câncer ou defeitos congênitos, que podem ocorrer tanto em células somáticas quanto germinativas, com consequências distintas para o indivíduo, o que reforça a

importância de avaliar seus efeitos sobre outras funções fisiológicas, como a reprodução.

O óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) tem se destacado como uma alternativa promissora aos anestésicos tradicionalmente utilizados na piscicultura, como o eugenol. Embora o eugenol seja amplamente empregado, a predominância de estudos focados exclusivamente nesse composto tem restringido a identificação e o desenvolvimento de outras opções naturais, seguras e eficazes para o manejo anestésico (Limma-Neto et al., 2016). Nesse sentido, a proposta de utilização do óleo essencial de manjeriço não visa substituir o eugenol, mas sim ampliar o leque de alternativas disponíveis. Apesar das evidências sobre sua elevada eficácia anestésica, com tempos adequados de indução e recuperação e características desejáveis para garantir o bem-estar animal durante o manejo (Teixeira et al., 2021; Schroder et al., 2021), o uso desse óleo ainda é considerado recente na aquicultura, especialmente no que diz respeito à sua aplicação em contextos reprodutivos. Dentre as espécies para as quais sua eficácia permanece pouco explorada, destaca-se o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*), cuja resposta ao uso do óleo essencial de manjeriço ainda carece de investigação.

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*), espécie reofílica, tem se destacado no meio científico pôr suas características favoráveis à pesquisa e à produção aquícola como o rápido crescimento, pequeno porte, dimorfismo sexual evidente, maturação sexual precoce (aos quatro meses de idade) e boa adaptação a diferentes ambientes (Moreira et al., 2021). O *A. lacustris* é capaz de se reproduzir em diferentes épocas do ano, sendo considerado como espécie-modelo, principalmente nos âmbitos da fisiologia reprodutiva e biotecnologias aplicadas à reprodução (Valandro et al., 2023; Garcia et al., 2019).

Desse modo, a adoção de protocolos que considerem o bem-estar animal, permite o controle da reprodução induzida, viabilizando a boa produtividade, reforçando a importância do lambari-do-rabo-amarelo como modelo experimental (Pereira et al., 2016; Valandro et al., 2023). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos anestésicos do óleo essencial de manjeriço e eugenol sobre o estresse fisiológico e a qualidade seminal de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*).

2. METODOLOGIA

2.1. Local e animais

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Piscicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande – MS (20°25'57"S e 55°17'11"W). Os peixes ($n=108$, com peso médio de 14,38 g) foram mantidos em tanques de manutenção de 100 m², alimentados com ração comercial com 32% de proteína bruta, duas vezes ao dia com uma relação de 5% peso vivo. Foi realizada a seleção desses peixes, com base no peso, comprimento padrão e total, e em seguida foram transferidos para caixas de polietileno (1000 L) com oxigenação constante por meio de um soprador de 1,5 CV com o uso de mangueira porosa de 0,80 m de diâmetro, onde foram mantidos até o início do experimento. A qualidade de água durante o período em que os peixes estiveram alocados na caixa de 1000 L se manteve em 6,39 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido; 27,29°C e pH 6,46. Ao final desse período (90 dias), os peixes foram transferidos para os aquários (20 L) e mantidos em jejum por 24 horas antes do início do experimento.

2.2. Delineamento experimental

Para a seleção dos peixes para compor as unidades experimentais, levou-se em consideração machos de lambari-do-rabo-amarelo *A. lacustris* sexualmente maduros, conforme as recomendações de Araújo et al. (2014).

Para o experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: (i) controle (sem adição de óleo essencial); (ii) óleo essencial de manjeriço (600 µL L⁻¹; em solução anestésica 3:10, 3 mL de óleo essencial de manjeriço para 10 mL de álcool 96%, resultando em uma solução mãe a 30%); e (iii) eugenol (500 µL L⁻¹; em solução anestésica 1:10, 1 mL de eugenol para 10 mL de álcool 96%, resultando em uma solução mãe a 10%).

Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições. Cada repetição foi composta por uma unidade experimental (aquários de 20 L, com água declorada, cuja oxigenação era fornecida por meio de pedras porosas) com seis peixes cada. Os peixes foram anestesiados simultaneamente para obter dois *pools* de sêmen (cada *pool* de três peixes) que foram submetidos a avaliação pelo CASA (Figura 1).

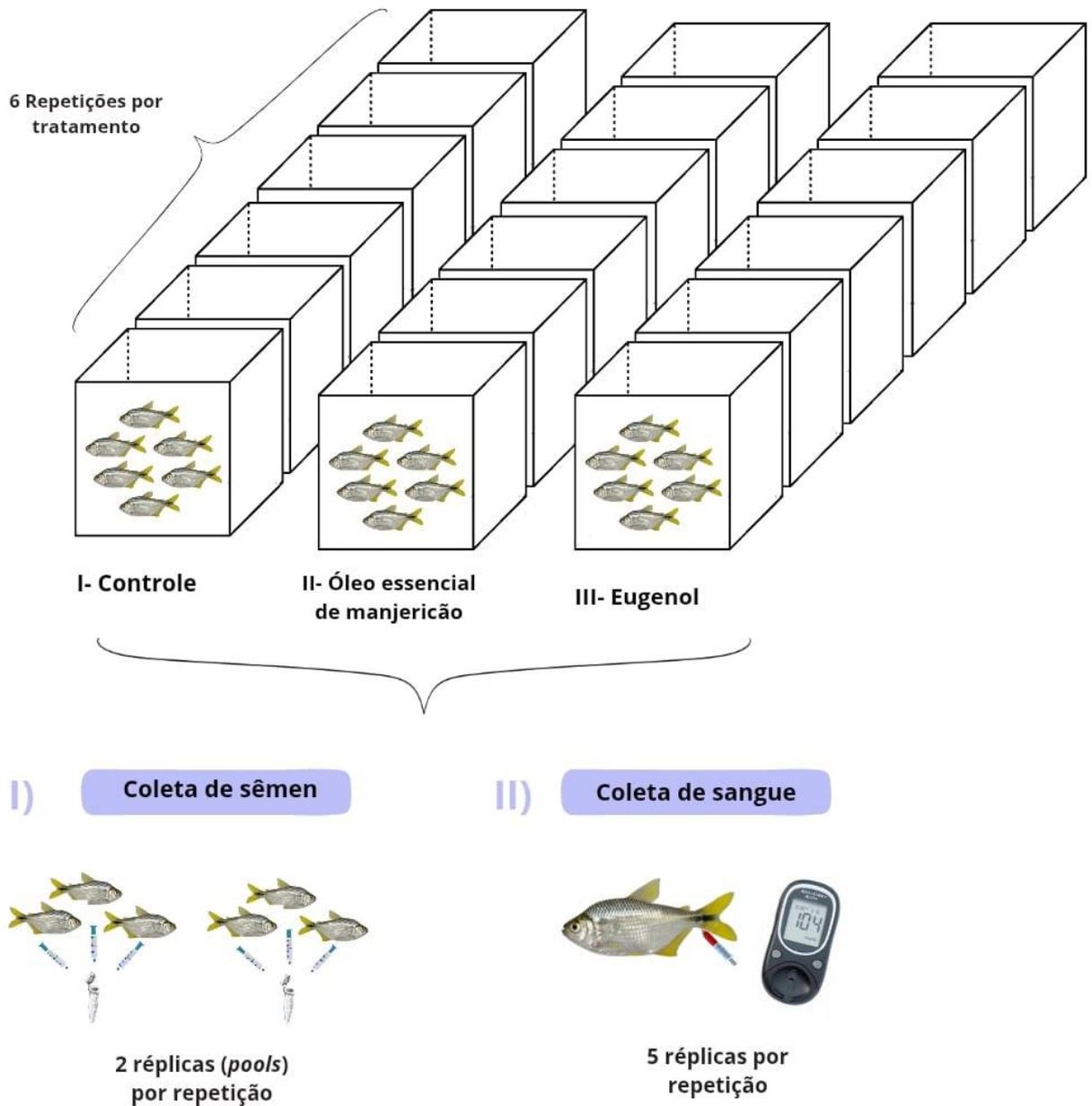


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental, com os tratamentos: Controle, Óleo Essencial de Manjeriço (OEM, $600 \mu\text{L L}^{-1}$) e Eugenol ($500 \mu\text{L L}^{-1}$). Os aquários (5 L) representam a indução anestésica de acordo com cada tratamento. Após a coleta de sêmen, para a realização dos *pools*, os peixes foram submetidos a coleta de sangue para a avaliação da glicose sanguínea em glicosímetro portátil.

2.3. Indução hormonal e coleta de sêmen

Para indução hormonal foi utilizada uma dose única de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de extrato de hipófise de carpa (EHC) via intraperitoneal sob a nadadeira peitoral direita (Yasui et al., 2015). Em seguida, os peixes foram direcionados aos respectivos aquários, e

mantidos até atingir as horas-grau necessárias para reprodução do lambari-do-rabo-amarelo (entre 180 e 250 UTA; Sato et al., 2003).

Para coleta do sêmen, os peixes foram alocados em aquários (5 L) com as respectivas concentrações anestésicas, até atingirem o estágio IV de anestesia, que foi caracterizado pelo mínimo movimento opercular, a ausência de movimentos natatórios e a cauda caída (Zimba et al., 2017).

2.4. Volume seminal, análise computadorizada assistida (CASA), concentração espermática e produção total de espermatozoides

Após a submissão aos diferentes tratamentos anestésicos (i: controle; ii: óleo essencial de manjeriço; e iii: eugenol), o sêmen foi coletado após pressão abdominal no sentido encéfalo-caudal com o auxílio de seringa graduada para mensuração do volume seminal. O sêmen coletado foi imediatamente diluído em Beltsville Thawing Solution - BTS® na proporção 1:1, de acordo com metodologia adaptada de Yasui et al. (2015), e em seguida, transferidas para microtubos de 1,5 mL para avaliações laboratoriais.

As análises computadorizadas foram realizadas por meio do CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) em triplicata. Foram coletados vídeos de movimentação espermática sincronicamente à ativação com água destilada (50 µL de água para cada 1 µL de sêmen) em microtubos de 1,5 mL. Após a ativação, 5 µL (sêmen + água destilada) foram depositados na câmara hematimétrica de Neubauer (0,1 mm de profundidade) e cobertos pela lamínula de vidro (24 x 24 mm) e em seguida levada a um microscópio de luz trinocular (LAB 180ITF) acoplado à uma câmera Sony DX4 configurada para a captura de imagens a 100 frames por segundos, conectada a um computador (sistema operacional Microsoft Windows 10®, processador Intel core i7®, CPU 3,8 GHz e 16 Gb de memória Ram) com objetiva de 20x previamente focada.

O software utilizado para a gravação dos vídeos foi o OBS Studio v29.1.3 e a duração de cada vídeo foi de 10 segundos. Os vídeos foram convertidos para o formato adequado (.avi) no software Dumbofab v7.2.4, processados no software VirtualDub 1.10.4 de acordo com descrições de Wilson-Leedy e Ingermann (2006) e repartidos em sequências de 100 imagens (1s) exatamente em 10 segundos pós-ativação. Em seguida, as sequências de imagens foram salvas em diretório específico e posteriormente importadas pelo software *ImageJ* (www.imagej.nih.gov/ij/) e processadas a partir do plugin CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*), utilizando-se as configurações adaptadas para peixes neotropicais brasileiros de Neumann et al.

(2013), considerando como móveis, as células com valores acima de 3, 10 e 20 $\mu\text{m s}^{-1}$ para VCL, VAP e VSL, respectivamente.

Através do plugin CASA, foi possível avaliar taxa de motilidade espermática (MOT, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média de deslocamento (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), progressão (PROG, μm), e frequência de batimento transposto (BCF, Hz).

Para determinação de concentração espermática, 1 μL de sêmen + BTS® foram diluídos em 1.000 μL de formol salino tamponado a 4,6% (1:1000). A contagem de células foi realizada de acordo com a metodologia de Spica et al. (2021), com estimativa em câmara hematimétrica de Neubauer. A produção total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptzs/peixe) foi obtida por meio da razão entre volume de sêmen (mL) pela concentração espermática ($\times 10^9$ sptzs/mL).

2.5. Análise hematológica e sobrevivência

Para análises hematológicas de glicose (mg dL^{-1}), após a coleta de sêmen, com o peixe ainda anestesiado, foi realizada a coleta de sangue (Figura 1). As amostras de sangue foram retiradas de cinco peixes de cada tratamento por punção da veia caudal usando seringas de 1 mL e agulhas descartáveis. O sangue coletado de cada peixe foi analisado em duplicata em aparelho portátil de glicose (Accu-Chek Guide®). Em seguida os peixes foram direcionados para o aquário de origem (de acordo com cada tratamento). Após 24 horas do manejo reprodutivo, foi realizada a contagem dos peixes para verificar a mortalidade e assim, obter a taxa de sobrevivência (TS) por meio da fórmula: $\text{TS}(\%) = (\text{n}^\circ \text{ de peixes após um período} / \text{n}^\circ \text{ inicial de peixes}) \times 100$.

2.6. Análise Estatística

Os dados foram obtidos foram submetidos a verificação dos pressupostos da ANOVA: Shapiro-Wilk (normalidade dos resíduos) e Levene (homogeneidade de variância). Para todas as variáveis de qualidade seminal os pressupostos foram atendidos, exceto BCF, e para a taxa de sobrevivência (%) que foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p > 0,05$). Logo, não foram utilizados testes de comparações múltiplas. Para glicose (mg dL^{-1}), foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos e foi utilizado o teste de Tukey para a comparação das médias. Todas as análises foram conduzidas no Sistema de Análises Estatísticas (SAS)

versão online (SAS OnDemand). Todos os testes foram realizados no nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar as características espermáticas como volume de sêmen (mL), concentração espermática ($\times 10^9$ sptzs mL⁻¹) e produção total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptzs/peixe), observou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nesses parâmetros. Os peixes submetidos ao tratamento com a indução anestésica em eugenol apresentaram volume de sêmen de 0,23 mL com produção total de espermatozoides de $4,86 \times 10^9$ sptzs/peixe. Já o tratamento controle apresentou concentração espermática de $6,14 \times 10^9$ sptzs mL⁻¹ com menos volume de sêmen (0,15 mL), o que resultou em uma produção total de espermatozoides $0,89 \times 10^9$ sptzs/peixe. O grupo com OEM apresentou volume de sêmen de 0,21 mL, com uma concentração espermática de $4,76 \times 10^9$ sptzs mL⁻¹, com uma produção total de espermatozoides de 1×10^9 sptzs/peixe (Figura 2).

Zanin et al. (2021) apontaram que a exposição a dose de 200 mg L⁻¹ de MS-222 reduziu a quantidade de espermatozoides disponíveis, indicando que doses intermediárias do anestésico influenciam negativamente a produção de sêmen, comprovando que o uso de anestésicos como os óleos essenciais, podem ser uma opção se corretamente administrados em termos de dosagem. Quanto ao volume seminal, este pode ser afetado quando não há uso de anestesia, uma vez que não há o relaxamento muscular necessário para a obtenção de espermatozoides, afetando consequentemente a concentração espermática (González et al., 2023).

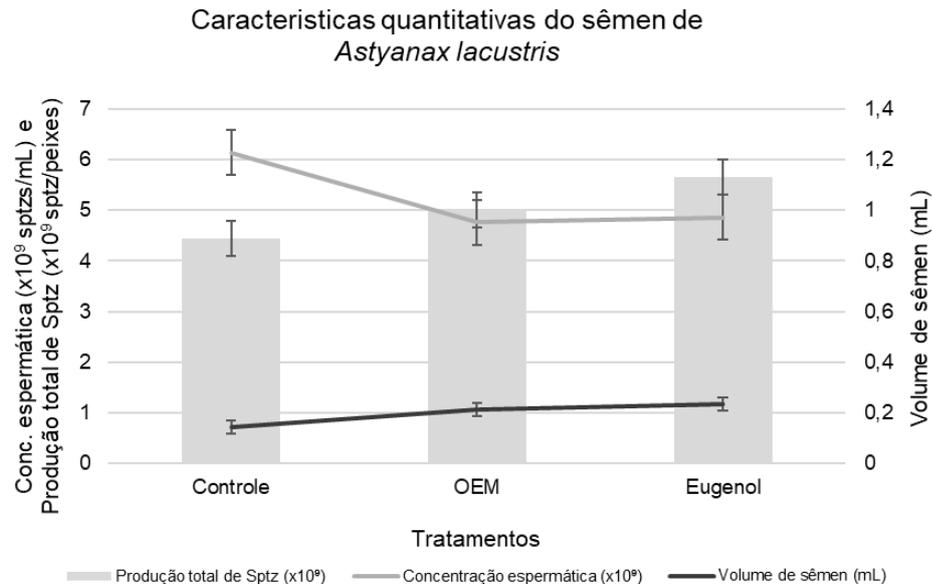


Figura 2. Características quantitativas do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) após indução anestésica com óleo essencial de manjeriço (OEM; $600 \mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol ($500 \mu\text{L L}^{-1}$); não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p > 0,05$). Sptz: espermatozoides.

A análise das variáveis cinéticas dos espermatozoides de *Astyanax lacustris* submetidos à indução anestésica com óleo essencial de manjeriço ($600 \mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol ($500 \mu\text{L L}^{-1}$), analisada em 10 segundos por meio do CASA, demonstrou que não houve diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis avaliadas ($p > 0,05$; Tabela 1). A motilidade espermática (MOT) variou de 36% para o manjeriço a 47% para o eugenol, mas não diferiu em relação ao controle 46%. Assim como as demais variáveis como as velocidades curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP) e velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB), progressão (PROG) e frequência de batimento transposto (BCF).

A qualidade espermática pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles o manejo e estresse durante a coleta de sêmen (Pereira et al., 2016). Sendo a MOT uma das principais variáveis que indicam a boa qualidade do sêmen (Godinho et al., 2000). No presente trabalho, não foram observadas diferenças entre os anestésicos avaliados. Entretanto, Pereira et al. (2016), ao utilizar eugenol a uma concentração de 120 mg L^{-1} , obteve redução na taxa de MOT quando comparado ao controle de sua pesquisa, enquanto no presente estudo, os peixes tratados com eugenol mantiveram a MOT em níveis semelhantes ao observado no grupo controle. Assim, mesmo diante da ausência de diferença significativa entre os tratamentos, a avaliação da qualidade seminal ainda é essencial, considerando especialmente a MOT como um dos

principais indicadores de viabilidade reprodutiva, uma vez que está diretamente relacionada ao sucesso da fertilização (Morisawa, 2008).

Tabela 1. Variáveis cinéticas de espermatozoides do sêmen de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) após indução anestésica com óleo essencial de manjeriço (600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) em 10 segundos de avaliação pelo CASA.

Variáveis	Tratamentos			
	Controle	OE de manjeriço ¹	Eugenol	p-valor
MOT (%)	46,50±0,38	36,00±0,49	47,60±0,37	0,5253
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	75,44±0,13	68,24±0,29	77,95±0,28	0,6576
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	65,13±0,15	61,15±0,27	68,68±0,25	0,7161
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	62,91±0,16	56,46±0,33	65,13±0,27	0,6607
STR (%)	95,50±0,03	90,80±0,33	93,00±0,05	0,5738
WOB (%)	85,50±0,03	91,20±0,05	88,60±0,09	0,2492
PROG (μm)	2591,75±0,16	2385,70±0,29	2715,38±0,25	0,6821
BCF (Hz)	46,69±0,15	54,91±0,27	47,20±0,13	0,6924 ²

MOT: motilidade espermática; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade em linha reta; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; PROG: progressão; BCF: frequência de batimento transposto. Para todas as variáveis os pressupostos foram atendidos, exceto BCF que foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis². Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p>0,05$). Logo, não foram utilizados testes de comparações múltiplas. ¹Óleo Essencial de manjeriço.

Além disso, alterações nas variáveis cinéticas como a VCL, VAP e VSL, podem refletir o impacto fisiológico do estresse sobre os espermatozoides. Estudos com outras espécies de peixes reforçam essa sensibilidade da qualidade espermática ao uso de anestésicos, como observado por Charoendat et al. (2009) e Pereira et al. (2016) com o uso de eugenol (120 mg mL⁻¹) em *Oreochromis niloticus*, resultando na redução da MOT. Teixeira et al. (2021) mostraram que a utilização de concentrações de 100, 200 e 300 mg L⁻¹ de tricafina (MS-222) anestésico sintético, as quais não foram eficazes na inibição da resposta ao estresse de *Rhamdia quelen*, resultando no aumento do cortisol e na diminuição de 20% na motilidade espermática, não sendo recomendadas no manejo de reprodutores dessa espécie. Já Zanin et al. (2021), observou que o uso de 400 mg L⁻¹ de tricafina (MS-222), em zebrafish (*Danio rerio*) não influencia nos parâmetros cinéticos dos espermatozoides.

Ao avaliar a taxa de sobrevivência (TS%) dos peixes após 24 horas do manejo reprodutivo, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos avaliados

(Figura 3). Contudo, o grupo submetido ao eugenol apresentou menor mortalidade (5 peixes), seguido do OEM (6 peixes) e do grupo controle (11 peixes). Estudos apontam que o uso de anestésicos em uma proporção adequada durante procedimentos como transporte e manejo reprodutivo pode ser determinante para a taxa de sobrevivência dos peixes, visto que quando o estresse não é controlado, pode ocorrer uma taxa de mortalidade significativa, consequente de desequilíbrios metabólicos e imunológicos (Bona et al., 2021).

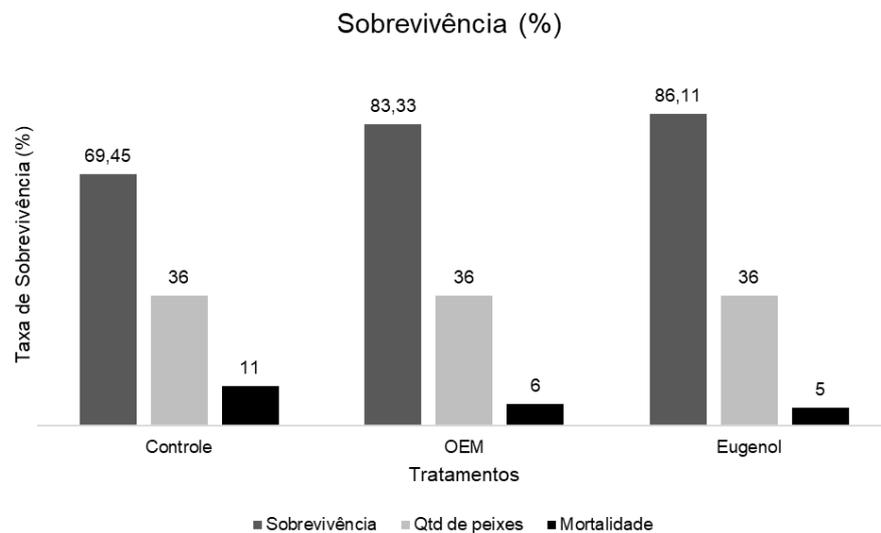


Figura 3 . Taxa de sobrevivência (%) de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) após indução anestésica com óleo essencial de manjeriço (OEM; 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) após 24 horas do manejo reprodutivo; a variável taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis avaliadas ($p > 0,05$). Qtd de peixes é o número de peixes em cada tratamento; mortalidade: total de peixes que morreram após 24 horas do manejo reprodutivo.

Correia et al. 2015, em sua pesquisa com o uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*, observou que a concentração de 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de manjeriço promoveu adequado tempo de indução e recuperação sem causar mortalidade nos peixes. Ventura et al. (2020) observaram que tanto o óleo essencial de manjeriço quanto o eugenol não causaram mortalidade e não diferiram significativamente em parâmetros fisiológicos em *Oreochromis niloticus*. Assim como Yigit et al. (2022), demonstraram que o uso de óleo essencial de manjeriço não apresentou efeitos tóxicos ou alterações histopatológicas em *Oncorhynchus mykiss*. Tais resultados sustentam a equivalência em termos de

sobrevivência encontrada no presente estudo com *Astyanax lacustris*, validando a comparação entre diferentes óleos essenciais sem prejuízo à mortalidade dos peixes.

A glicose sanguínea representa um indicador de estresse em peixes (Da Silveira et al., 2009). Em condições de estresse, hormônios como adrenalina e noradrenalina são liberados na corrente sanguínea dos peixes, e associados ao cortisol elevam a produção de glicose, a fim de suprir a demanda energética do animal, mantendo seu estado fisiológico estável (Bido et al., 2016; Bona et al., 2021). No presente estudo, foi observado ($p < 0,05$) que os tratamentos com o óleo essencial de manjeriço (OEM) e eugenol não mitigaram o estresse causado nos peixes durante o manejo reprodutivo. O OEM promoveu um aumento significativo nos níveis de glicose ($75,54 \text{ mg dL}^{-1}$) nos peixes desse grupo em relação ao controle ($61,46 \text{ mg dL}^{-1}$), seguido do eugenol ($69,14 \text{ mg dL}^{-1}$) que não diferiu do grupo controle (Figura 4).

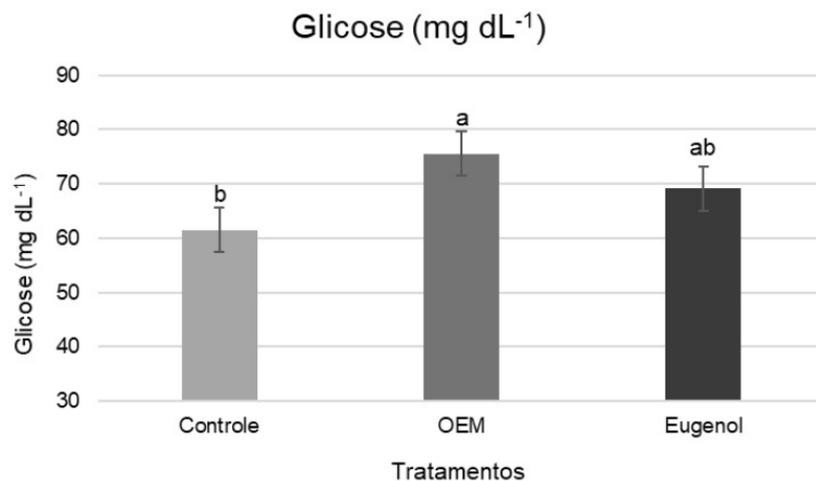


Figura 4. Glicose sanguínea (mg dL^{-1}) em lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) submetidos a indução anestésica com óleo essencial de manjeriço (OEM; $600 \mu\text{L L}^{-1}$) e eugenol ($500 \mu\text{L L}^{-1}$) após o manejo reprodutivo de coleta de sêmen. Letras distintas ($p=0,0449$) indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Peixes de cultivo que são mantidos em sistemas mais intensivos de criação ficam expostos a diversas situações estressantes (Pereira-da-Silva et al., 2009). Diante disso, a busca por métodos que possam reduzir o estresse desses animais tem aumentado a cada ano. E nesse sentido, com o objetivo de diminuir o efeito dos agentes estressores nos peixes, tem-se utilizados anestésicos visando a prevenção de lesões (Coyle et al., 2004) e a redução na perda de peixes (Ashley, 2007). Assim, os óleos essenciais, além de sua utilização voltada a alimentação de peixes, exercendo a função de aditivos, como apresenta De Souza et al., (2017) em seu

estudo, que a utilização de óleo essencial de manjeriço na dieta de *Oreochromis niloticus* resulta na redução dos níveis de glicose no animal, têm despertado interesse como anestésicos, visando diminuir a sequência de alterações endócrinas causadas pelo estresse durante os procedimentos de manejo, conduzindo os peixes a um estado de perda parcial ou completa da percepção de estímulos, de tal forma que o peixe não retorna a sua postura normal de nado na coluna de água por determinado período (Pereira-da-Silva et al., 2009).

Contudo, as pesquisas que envolvem a avaliação de estresse nos peixes têm se limitado a observações durante o manejo de transporte, e poucos (Pereira et al., 2016; Godinho et al., 2000) tem relacionado o uso de anestésicos naturais durante o manejo reprodutivo. O aumento do estresse nos peixes pode afetar diretamente os níveis de glicose sanguínea (Bona et al., 2021). Simões-Bueno et al. (2024) relatam que peixes submetidos a anestesia com óleo essencial de *Lippia alba* (180 mg L^{-1}) apresentaram elevados níveis de glicose sanguínea. Entretanto, Façanha et al. (2005), ao utilizar mentol como anestésico observou que a glicose foi significativamente menor em peixes expostos a 100 mg L^{-1} , do que os expostos a 200 e 250 mg L^{-1} , comprovando que a administração ideal de anestésicos não causa distúrbios nos níveis de glicose em peixes dessa espécie.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a anestesia com óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e com eugenol não foi eficaz na mitigação dos efeitos fisiológicos do estresse em *Astyanax lacustris* durante o manejo reprodutivo, conforme evidenciado pelos níveis de glicose sanguínea. No entanto, ambos os anestésicos se mostraram seguros quanto à preservação da qualidade espermática, não apresentando efeitos negativos sobre as características analisadas. Esses resultados indicam que, embora o uso desses compostos não reduza os indicadores de estresse agudo, sua aplicação pode ser considerada viável em protocolos reprodutivos, especialmente quando se busca garantir a integridade do sêmen coletado.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT - 130624); do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ - 150010/2024-9) e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, DALCIO RICARDO; YASUI, GEORGE SHIGUEKI. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

ARAÚJO, J.Ê.X.S., STREIT, D.P., RIBEIRO, J.S. DE A., MARTINS, E. DE F.F., SOUZA, F.N., DE OLIVEIRA, C.A.L., RIBEIRO, R.P., LOPERA-BARRERO, N.M., POVH, J.A. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leirius marmoratus* (Gill, 1970). **Brazilian Arch. Biol. Technol.** 57, 882–886, 2014.

ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 104, p. 199-235, 2007.

BIDO, ADRIANE FEDERICI. Indicadores de estresse em curimba (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836) em escada para peixes, no Alto Rio Paraná, Brasil. 2016.

BONA, ALLINY MAGALHÃES. Mitigando a toxicidade do óleo de cravo-da-índia durante a anestesia de tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Tese de Doutorado**. Brasil. 2021.

CHAROENDAT, U., AREECHON, N., SRISAPOOME, P., & CHANTASART, D. Efficacy of synthetic eugenol as an anesthetic for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). **Agriculture and Natural Resources**, v. 43, n. 5, p. 132-140, 2009.

CORREIA, A. M. Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii*, 2015.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, H.J. Anaesthetics in Aquaculture. SRAC Publication No. 3900. **Southern Regional Aquaculture Center**, USA. 2004

DA SILVEIRA, ULISSES SIMON; LOGATO, PRISCILA VIEIRA ROSA; PONTES, E. Fatores estressantes de peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 1001-1017, 2009.

DE SOUZA, ELIZANGELA MARIA. Uso de óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* e *Ocimum basilicum* como aditivos nutricionais e antimicrobianos em juvenis de Tilápia-do-Nilo. 2017.

DOS SANTOS NASCIMENTO, Héline et al. Genotoxicity evaluation of three anesthetics commonly employed in aquaculture using *Oreochromis niloticus* and *Astyanax lacustris*. **Aquaculture reports**, v. 17, p. 100357, 2020.

DOS SANTOS TEIXEIRA, N., MARQUES, L. S., RODRIGUES, R. B., GUSSO, D., PINHEIRO, G. T., MACHADO, T. L. F., & STREIT JR, D. P. Effects of anesthetic MS-222 on stress and reproduction of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) males. **Animal Reproduction Science**, v. 225, p. 106669, 2021.

FAÇANHA, MICHELLE FERREIRA; GOMES, LEVY DE CARVALHO. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 35, p. 71-75, 2005.

GARCIA, YASMIN. Biologia reprodutiva e genética de *Astyanax lacustris*: avaliação da razão sexual em cultivo. 2019.

GODINHO, H.P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 203, p. 6-20, 2000.

GODOY, A. C., FANTINI-HOAG, L., OLIVEIRA, D. F. R., FERREIRA, A. C., BITTENCOURT, F., SCARDUA, M. P., ... & NEU, D. H. Anesthesia Using Eugenol for Two Weight Classes of *Piaractus mesopotamicus*: Evaluation of Induction Time, Recovery Time, Behavioral, **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 46, n. 11, p. 305-314, 2024.

GONZÁLEZ, R., MILLER, A., VANSANDT, L. M., & SWANSON, W. F. Characterization of basal seminal traits and semen cryopreservation in Canada lynx (*Lynx canadensis*). **Theriogenology Wild**, v. 2, p. 100026, 2023.

LIMMA-NETTO, J. D., SENA, A. C., & COPATTI, C. E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia, and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, 42, 727-733, 2016.

LINS, A. T. L. A., DE ARAÚJO, D. B., EIRÓ-QUIRINO, L., DA PAZ, C. A., DE SOUSA REIS, T., DE SOUZA, L. V., ... & HAMOY, M. Amyris balsamifera essential oil promotes anesthesia in *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): electrophysiological tools in the indication of a therapeutic window. 2025.

MOREIRA, JULIA MERÇON FERNANDES. Evidências de alterações bioquímicas e reprodutivas em *Astyanax lacustris* (Lutken, 1875) (Teleostei: characiformes) do Rio Doce após desastre ambiental em Mariana/MG. **Tese de Doutorado**. Brasil. 2021.

MORISAWA, M. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 362-370, 2008.

- MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p.516-534, 2010.
- NEUMANN, G.; BOMBARDELLI, R. A.; REBECHI DE TOLEDO, C. P.; SANCHES, E. A. Análise espermática computadorizada em peixes de água doce: procedimentos para uso do aplicativo CASA em software livre. **Os Autores**, Toledo, PR, Brasil, 2013.
- NUNES, L. T., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B., REIS, F. Y. T., NERES, R. W. P., & DA SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **R. Bras. Reprod. Anim**, p. 15-21, 2018.
- PEREIRA, P. N. B., DA SILVA, A. C., TEIXEIRA, E. G., & FARIAS, W. R. L. Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 10(3), 415-435, 2016.
- PEREIRA-DA-SILVA, E.M., OLIVEIRA, R.H.F. DE, RIBEIRO, M.A.R., COPPOLA, M.P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural** ,39, 1851–1856, 2009.
- SAS – Statistical Analysis System User's guide. Cary: SAS Institute, 2002. 525p. (Version 9.00).
- SATO, Y., FENERICH-VERANI, N. GODINHO, H.P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho, H.P., Godinho, A.L., Eds., Águas e peixes no São Francisco das Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, p. 275-290, 2003.
- SILVA, B. A. D. O., FERREIRA, A. L., ACUNHA, R. M. G., ALMEIDA, R. G. D. S., DOS SANTOS, J. G., FERNANDES, C. E., ... & COSTA, D. C. Anesthetic efficiency of essential oil of *Zingiber officinale* for *Astyanax lacustris*: induction time, recovery time, ventilatory frequency, and gill histopathology. **Aquaculture International**, v. 32, n. 4, p. 3733-3746, 2024.
- SIMÕES-BUENO, L. N., COPATTI, C. E., GOMES, L. C., VAL, A. L., AMANAJÁS, R. D., CARON, B. O., ... & BALDISSEROTTO, B. Linalool chemotype essential oil from *Lippia alba* in the anesthesia of fat snook (*Centropomus parallelus*): ventilatory rate, biochemical, antioxidant, and oxidative status parameters. **Neotropical Ichthyology**, v. 22, p. e230114, 2024.
- SCHRODER, CHAIANA SCHAFFER. Influência do uso de óleo essencial de eugenol e de manjeriço (*Ocimum basilicum*) na água de transporte pré-abate de tilápias criadas pela agricultura familiar. 2021.
- SPICA, L.N., SANCHES, E.A., JUNIOR, D.P.S., FILHO, R.A.C.C., DE OLIVEIRA BRASILEIRO, L., RODRIGUES, R.B., KASAI, R.Y.D., POVH, J.A. Successive seminal collections from *Leiarius marmoratus* during the reproductive period. **Anim. Reprod. Sci.** 234, 106852, 2021.

VALANDRO, JANAÍNA SAYURI IMAFUKU. Desempenho reprodutivo do Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) criados em diferentes sistemas fechados de produção. 2023.

VENTURA, A. S., JERÔNIMO, G. T., DE OLIVEIRA, S. N., DE ARAÚJO GABRIEL, A. M., CARDOSO, C. A. L., TEODORO, G. C., ... & POVH, J. A. Et al. Natural anesthetics in the transport of Nile tilapia: Hematological and biochemical responses and residual concentration in the fillet. *Aquaculture*, v. 526, p. 735365, 2020.

WILSON-LEEDY J.G., INGERMANN R.L. Development of a novel CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters, *Theriogenology*, 67(3):661-72, 2006.

YASUI, G.S., SENHORINI, J.A., SHIMODA, E., PEREIRA-SANTOS, M., NAKAGHI, L.S.O., FUJIMOTO, T., ARIAS-RODRIGUEZ, L., SILVA, L.A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal* 9(3), 464-470, 2014.

YASUI, G.S., SENHORINI, J.A., SHIMODA, E., PEREIRA-SANTOS, M., NAKAGHI, L.S.O., FUJIMOTO, T., ARIAS-RODRIGUEZ, L., SILVA, L.A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9, 464–470, 2015.

YIGIT, N. O., METIN, S., SABUNCU, O. F., DIDINEN, B. I., DIDINEN, H., OZMEN, O., & KOSKAN, O. Efficiency of *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* essential oils on anesthesia and histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 53, n. 5, p. 1051-1061, 2022.

ZANIN, M., JUNIOR, A. S. V., ACOSTA, I. B., GHELLER, S. M. M., ZIMERMANN, E., FROES, C. N., GEHRCKE M. I. CORCINI, C. D. Tricaine methanesulfonate (MS-222) on the spermatoc quality of zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 533, p. 736090, 2021.

ZIMBA, R.D., SUSSEL, F.R., OLIVEIRA, K.R.B. DE, SEGURA, J.G., LIMA, C.G. DE, VIEGAS, E.M.M., 2017. Desempenho reprodutivo de lambaris alimentados com grãos secos de destilaria. **Bol. do Inst. Pesca**, 43, 20–34, 2017.