

USO DO EUGENOL EM BETTAS: ESTUDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ADMINISTRAÇÕES SUCESSIVAS

Thiago El Hadi Perez FABREGAT¹; Manuela Martins PEREIRA¹; Toshiro Barreto ASSAHINA¹; José Augusto BROGGI¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações e da administração sucessiva de eugenol sobre a resposta anestésica em bettas (*Betta splendens*), sendo realizados dois experimentos. No primeiro, os peixes foram submetidos a diferentes concentrações de anestésico (70,0; 87,5; 105,0; 122,5 e 140,0 mg L⁻¹). No segundo experimento foi utilizada uma única concentração de anestésico (140,0 mg L⁻¹), aplicada em três dias sucessivos. No experimento 1, o aumento da concentração de eugenol resultou em redução do tempo até a anestesia profunda. No experimento 2, o tempo até a anestesia profunda foi maior no terceiro dia em relação ao primeiro. O aumento da concentração de eugenol acelerou a resposta anestésica em bettas, embora a recuperação não tenha sido afetada. A concentração de 140,0 mg L⁻¹ é a recomendada para o manejo de bettas.

Palavras chave: anestesia; *Betta splendens*; peixe ornamental

THE USE OF EUGENOL IN BETTAS: A STUDY OF DIFFERENT CONCENTRATIONS AND SUCCESSIVE ADMINISTRATIONS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of different concentrations and successive administrations of eugenol on the anesthetic response in bettas (*Betta splendens*). Two experiments were conducted. In the first trial, the fish were exposed to different concentrations of eugenol (70.0, 87.5, 105.0, 122.5 e 140.0 mg L⁻¹). Only one concentration of anesthetic was evaluated in the second experiment (140.0 mg L⁻¹), which was applied for three successive days. In the first experiment, the increase of the concentration of the eugenol reduced the time to induce total anesthesia. In the second experiment, the time to induce total anesthesia was longer on the third day as compared to the first day. It is possible to conclude that an increase in the concentration of eugenol accelerated the anesthetic response in the bettas, though the recovery was not affected. The concentration of 140.0 mg L⁻¹ is the most recommended for the handling of bettas.

Keywords: anesthesia; *Betta splendens*; ornamental fish

Nota Científica: Recebida em 18/05/2014 - Aprovada em 14/04/2015

¹ Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Av. Luis de Camões, 2090 - CEP: 88520-000 - Lages - SC - Brasil. e-mail: thiagofabregat@hotmail.com (autor correspondente); manuela-2402@hotmail.com; toshiro_verdugo@hotmail.com; joseabroggi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Na piscicultura, o uso de anestésicos é uma prática que facilita o manejo e o transporte, reduzindo as injúrias e ferimentos aos animais. Os anestésicos são definidos como agentes farmacológicos que possuem a capacidade de induzir nos peixes a perda parcial ou total da percepção dos estímulos externos (IWANA e ACKERMAN, 1994). Um fator limitante para o uso desses produtos é a falta de conhecimento das concentrações e do tempo de exposição adequados para cada espécie de peixe. Assim, existe a necessidade de determinação de concentrações adequadas, uma vez que concentrações excessivas podem provocar alterações metabólicas, levando à morte dos peixes (PARK *et al.*, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2012).

No Brasil, o fármaco anestésico mais utilizado na piscicultura é a benzocaína (GOMES *et al.*, 2001). Trata-se de um composto eficaz na indução da reposta anestésica e que possui uma margem de utilização segura, mas o seu uso é cada vez mais restrito, pois o tempo de depuração é longo (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012). Uma alternativa que tem se destacado é o uso do eugenol (4-alil-2-metoxifenol), princípio ativo do óleo de cravo, obtido da destilação do cravo-da-índia (*Eugenia Caryophyllata*). Trata-se de um composto fenólico, com efeito depressor do sistema nervoso central (ANDERSON *et al.*, 1997), de baixo custo e toxidez, que pode ser facilmente adquirido e produzido, com alto grau de eficiência (SOTO e BURHANUDDIN, 1995; KEENE *et al.*, 1998; GUÉNETTE *et al.*, 2007; ROSS e ROSS, 2008).

Embora o eugenol seja considerado uma substância segura, pois é facilmente metabolizado e excretado pelo animal (GUÉNETTE *et al.*, 2007), existem evidências de efeitos tóxicos. Para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e o kinguio (*Carassius auratus*) foi observada mortalidade após uma única exposição aguda ao eugenol nas concentrações acima de 100 e 75 mg L⁻¹, respectivamente (VIDAL *et al.*, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2012). As informações disponíveis na literatura sobre a exposição crônica ao eugenol são limitadas; para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não houve alteração na resposta anestésica (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012), mas resultados obtidos para

truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) indicam que ocorre acúmulo de eugenol no organismo após exposições sucessivas (GUÉNETTE *et al.*, 2007).

A criação de peixes ornamentais é uma excelente alternativa de renda para o pequeno produtor. Entre as espécies cultivadas, uma que se destaca é o betta (*Betta splendens*), também conhecida como “Siamese Fighting Fish”. Originário do sudeste asiático (Tailândia, Malásia), apresenta cores e nadadeiras exuberantes, sendo considerado um dos mais populares peixes ornamentais de águas tropicais. Na natureza, podem ser encontrados nos tabuleiros dos campos de arroz, pequenos lagos e locais com pouca renovação de água, que proporciona ambientes com baixo teor de oxigênio dissolvido. Em função da evolução nestas condições, o comportamento respiratório característico do betta, mesmo quando a concentração de oxigênio na água está adequada, é subir à superfície e utilizar o órgão suprabranquial, o labirinto, para captar e respirar o oxigênio atmosférico (REID *et al.*, 2006).

Durante o manejo dos bettas em cativeiro, pode ser necessária a utilização de substâncias anestésicas, às vezes durante dois ou mais dias sucessivos, e não existem resultados claros sobre o tempo de depuração do eugenol (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012). Assim, diante da necessidade de definir concentrações adequadas para o manejo, e em função das particularidades da espécie, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações e da administração sucessiva de eugenol sobre a resposta anestésica dos bettas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Piscicultura do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC), em Lages-SC, compreendendo dois experimentos. No primeiro, foi definida uma concentração adequada para o manejo dos peixes e, no segundo, foi observado o efeito de concentrações sucessivas de eugenol sobre a resposta anestésica. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC com o número de protocolo CETEA/UDESC 1.13.13.

Foram utilizados 110 machos de bettas ($0,97 \pm 0,24$ g) obtidos por reprodução das matrizes do próprio laboratório. Foram selecionados indivíduos em boas condições nutricionais e de saúde, que foram aclimatados às condições experimentais durante 30 dias. Durante a aclimação, os peixes foram mantidos isolados visualmente entre si em recipientes individuais de 2 L, instalados em caixas plásticas de 40 L, em sistema de banho termostático para manutenção da temperatura da água constante ($27\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia, com ração contendo 32% de proteína e, diariamente, foram realizadas trocas parciais de água (50% do volume). Antes dos ensaios, os peixes ficaram em jejum por 24 h. Nos experimentos, foi utilizado um aquário teste e um aquário de recuperação, ambos com capacidade de 2 L. Todos os indivíduos foram avaliados nos dois aquários e, para cada peixe avaliado, a água era totalmente renovada.

No experimento 1, os peixes foram submetidos a diferentes concentrações de anestésico: 70,0; 87,5; 105,0; 122,5 e 140,0 mg L⁻¹. O eugenol utilizado estava sob a forma de hidrolato de eugenol, um composto hidrossolúvel, na concentração de 70 mg mL⁻¹. As concentrações foram determinadas previamente por meio de

ensaios pilotos e o delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 20 repetições. No experimento 2, os procedimentos foram similares aos do primeiro experimento, porém, a única concentração de anestésico avaliada foi a de 140,0 mg L⁻¹, definida com base nos resultados do experimento 1, administrada em três dias sucessivos. Após cada dia de avaliação, os peixes eram devolvidos para os recipientes individualizados de recuperação, alimentados e a água totalmente renovada. Foram realizadas 10 repetições. Nos dois experimentos, as avaliações eram realizadas sempre no mesmo horário (16:00-17:00 h) e cada indivíduo foi considerado uma repetição.

Logo após adição do anestésico na água, o peixe foi colocado no aquário teste e, por meio de observação, foi registrado o tempo (com auxílio de cronômetro digital) até a indução da anestesia profunda, considerada quando o comportamento do peixe estava de acordo com o estágio IV dos estágios anestésicos definidos por ROSS e ROSS (2008) (Tabela 1). Para isto, foi feita a contagem dos batimentos operculares, enquanto que a ausência de reação a estímulos foi verificada pelo toque na lateral do peixe com um bastão de vidro. Uma vez atingido o estágio IV, o peixe foi imediatamente retirado do aquário teste e colocado no aquário de recuperação, para registro do tempo de recuperação. Após os experimentos, os peixes foram monitorados durante sete dias para verificar a ocorrência de mortalidade.

Tabela 1. Estágios de anestesia em peixes (adaptado de ROSS e ROSS, 2008).

Estágio	Descrição	Resposta Comportamental
0	Normal	Reativos a estímulos externos; batimentos operculares normais; reação muscular normal.
I	Sedação Leve	Reativos a estímulos externos; movimentos reduzidos, batimentos operculares mais lentos; equilíbrio normal.
II	Sedação Profunda	Perda total da reatividade aos estímulos externos, exceto forte pressão; leve queda do movimento opercular; equilíbrio normal.
III	Narcole	Perda parcial do tônus muscular; natação errática, aumento dos movimentos operculares; reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração.
IV	Anestesia profunda	Perda total de tônus muscular; perda total de equilíbrio; batimento opercular lento, porém regular.

Os parâmetros de qualidade de água, aferidos tanto no aquário teste como no aquário de recuperação, foram temperatura (termômetro de

álcool), pH (medidor portátil Lutron, modelo PH-221), oxigênio dissolvido (oxímetro Lutron, modelo DO-5519) e concentração de amônia total

(segundo metodologia descrita por EATON *et al.*, 2005). Os resultados foram submetidos a testes de normalidade dos erros (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (Teste de Levene), antes de serem comparados estatisticamente entre o aquário teste e de recuperação, utilizando-se o Teste t ($p < 0,05$).

No experimento 1, os resultados do tempo de anestesia e de recuperação foram analisados estatisticamente por meio de Análise de Variância Paramétrica (ANOVA) e, quando houve diferença significativa, submetidos à análise de regressão para obtenção da curva de resposta ao anestésico. No experimento 2, os resultados de tempo de anestesia e de recuperação foram analisados por meio do teste de ANOVA de medidas repetidas (tempo), e quando houve diferença significativa, submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Nos dois experimentos, a frequência de batimentos operculares foi comparada antes e depois da anestesia profunda pelo Teste t ($p < 0,05$) e entre os dias, pelo teste de ANOVA. Antes das análises, todos os dados foram submetidos a testes para verificação da normalidade dos erros (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (Teste de Levene). Foi utilizado o programa estatístico SAS 8.0.

RESULTADOS

Nos dois experimentos, os parâmetros de qualidade da água não variaram ($p > 0,05$) entre o aquário teste e o aquário de recuperação (temperatura $27,8 \pm 0,3$ °C; pH $7,81 \pm 0,51$; oxigênio dissolvido $5,68 \pm 1,08$ mg L⁻¹; e amônia total $0,02 \pm 0,07$ ppm). No experimento 1, o aumento da concentração de eugenol diminuiu ($p < 0,05$) o tempo até a anestesia profunda dos bettas (Figura 1). O estágio de anestesia profunda foi confirmado pela diminuição dos batimentos operculares (de $12,07 \pm 1,93$, antes da exposição do anestésico, para $1,83 \pm 1,56$ batimentos min⁻¹ após a anestesia; $p < 0,05$) e pela perda do equilíbrio.

Tabela 2. Tempo médio (\pm desvio padrão) de resposta anestésica dos bettas (*Betta splendens*) entre dias consecutivos de exposição ao eugenol (140,0 mg L⁻¹).

Tempo de resposta (s)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%
Anestesia profunda	211,5 \pm 124,5a	305,1 \pm 181,9ab	448,6 \pm 321,9b	74,24
Recuperação	759,2 \pm 329,8	686,9 \pm 276,6	971,9 \pm 760,1	62,27

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A frequência de batimentos operculares não variou ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Todos os peixes se recuperaram no final das avaliações e o tempo de recuperação não variou ($p > 0,05$) entre as diferentes concentrações. O tempo de recuperação médio foi de $699,92 \pm 337,81$ s ($11,65 \pm 5,63$ min) Não houve mortalidade decorrente da exposição dos peixes ao eugenol.

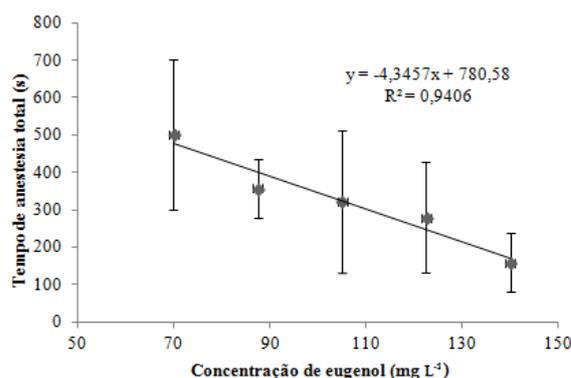


Figura 1. Relação entre o tempo médio de anestesia profunda (s) e a concentração de eugenol (mg L⁻¹) em bettas (*Betta splendens*). Médias diferem entre si pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$); barras indicam desvio padrão.

No experimento 2, a exposição em dias sucessivos alterou o tempo de resposta ao anestésico (Tabela 2). O tempo até a anestesia profunda foi maior ($p < 0,05$) no terceiro dia em relação ao primeiro, não havendo diferença ($p > 0,05$) entre o segundo e o terceiro dia. O estágio de anestesia profunda também foi confirmado pela diminuição dos batimentos operculares verificados antes e depois da exposição dos peixes ao anestésico (de $11,78 \pm 1,78$ para $1,60 \pm 1,43$ batimentos min⁻¹, respectivamente; $p < 0,05$) e pela perda do equilíbrio. A frequência de batimentos operculares e o tempo de recuperação não variaram ($p < 0,05$) entre os diferentes dias. Assim como no experimento 1, não houve mortalidade decorrente da exposição dos peixes ao eugenol.

DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade da água se mantiveram dentro dos padrões adequados para o cultivo de peixes (BOYD, 2000). O aumento da concentração de eugenol na água resultou em uma resposta anestésica mais rápida. Resultados semelhantes foram encontrados para a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (SLADKY *et al.*, 2001), matrinhã (*Brycon cephalus*) (INOUE *et al.*, 2003), lambari (*Astyanax altiparanae*) (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012; SIMÕES *et al.*, 2012). A obtenção de menor tempo de indução anestésica é importante para minimizar o estresse dos animais (RIBEIRO *et al.*, 2013). Devido a ação dos anestésicos no metabolismo, ocorre a liberação de corticosteroides e catecolaminas, e quanto mais rápida for a resposta anestésica, menor será a liberação destas substâncias (ROTHWELL *et al.*, 2005).

O tempo até a anestesia profunda nos bettas variou entre 159 segundos (2,65 min) na concentração de 140,0 mg L⁻¹ até 501 segundos (8,30 min) na concentração de 70,0 mg L⁻¹. Para o kinguio, o tempo até a anestesia profunda foi de 4,88 min na concentração de 75 mg L⁻¹ (BITTENCOURT *et al.*, 2012). Em outras espécies, a indução foi ainda mais rápida; para o pintado, a concentração de 75 mg L⁻¹ induziu anestesia profunda em 0,82 minutos (VIDAL *et al.*, 2006). Para o dourado (*Salminus brasiliensis*), a concentração de 60 mg L⁻¹ induziu a anestesia profunda em 1,45 minutos (HISANO *et al.*, 2008). Uma concentração ainda menor, de 50 mg L⁻¹ induziu a anestesia de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em 1,53 minutos (GONÇALVES *et al.*, 2008). Estes dados indicam que o betta necessita de concentrações de eugenol mais elevadas que outras espécies para obtenção de uma resposta anestésica adequada para seu manejo. Peixes de pequeno porte possuem a superfície branquial comparativamente maior em relação a peixes grandes, respondendo mais rapidamente aos anestésicos (ROUBACH *et al.*, 2005). O betta é uma espécie de pequeno porte, mas a habilidade desta espécie de respirar o ar atmosférico (REID *et al.* 2006) pode ter interferido na forma como o anestésico foi absorvido.

No presente estudo, o tempo médio de recuperação (11,65 min) foi maior do encontrado para outros anestésicos rotineiramente utilizados na piscicultura, como o MS222 e a benzocaína, cujo tempo de recuperação é menor do que 10 min, conforme PÉREZ-GIANESELLI e FLORES-QUINTANA (2009). Além disso, para uma substância ser considerada um anestésico eficiente para peixes, de acordo como uma lista de características de anestésico ideal elaborada por KEENE *et al.* (1998), o tempo de recuperação deve ser preferencialmente menor que cinco minutos. Entretanto, o eugenol não pode ser considerado um anestésico inadequado para bettas, pois cinco minutos é um valor de referência recomendado pelos autores para espécies de metabolismo mais ativo, como a truta arco-íris, e outras espécies podem ter uma resposta metabólica mais lenta. Enquanto para a tilápia, o tempo de recuperação do eugenol foi de 4 min (VIDAL *et al.*, 2008; DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012), para o kinguio, o tempo de recuperação foi de mais de 15 min com a utilização da concentração de 75 mg L⁻¹ (BITTENCOURT *et al.*, 2012).

Assim como no presente estudo, INOUE *et al.* (2003) e GRUSH *et al.* (2004) também não encontraram relação da concentração de eugenol com o tempo de recuperação. A variabilidade dos resultados foi grande, possivelmente provocada por diferenças individuais entre a tolerância aos anestésicos. Embora tenham sido encontradas diferenças no tempo até a anestesia profunda, esta variação nos resultados pode ter impedido a detecção de diferenças significativas para o tempo de recuperação. Em contraste, SLADKY *et al.* (2001), PEREIRA-DA-SILVA *et al.* (2009) e BITTENCOURT *et al.* (2012), trabalhando com a pirapitinga, lambari e o kinguio, respectivamente, observaram aumento do tempo de recuperação com concentrações de eugenol mais elevadas. Como neste trabalho não houve diferença no tempo de recuperação e também não foi observada mortalidade nos peixes submetidos ao eugenol em nenhum dos tratamentos, a concentração de 140,0 mg L⁻¹ pode ser recomendada para os bettas, pois a resposta anestésica foi mais rápida.

Durante o manejo, em biometrias por exemplo, pode ser necessária a exposição dos bettas a anestésicos em dias sucessivos, e os dados

apresentados são pioneiros em relatar alterações na resposta anestésica desses peixes ao eugenol, indicando que, no terceiro dia de exposição sucessiva, a resposta ao anestésico foi mais lenta. Poucos dados foram encontrados na literatura e ainda não existem resultados conclusivos sobre como a exposição crônica aos fármacos pode interferir na resposta anestésica dos peixes. Para a tilápia do Nilo, a exposição ao eugenol em dois dias sucessivos não foi suficiente para provocar alterações na resposta anestésica (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012). Evidentemente, são espécies diferentes, mas no estudo com tilápias, o período de tempo avaliado pode ter sido insuficiente, uma vez que, nos bettas, somente após três dias foi detectada diferença no tempo até a anestesia profunda. A necessidade de concentrações crescentes do eugenol para uso sucessivo em bettas pode aumentar potenciais riscos do uso desse anestésico para a espécie, e sempre que possível, esta prática deve ser evitada.

CONCLUSÕES

O aumento da concentração de eugenol acelera a resposta anestésica em *B. splendens*, embora a recuperação não seja afetada. Dentre as concentrações avaliadas, 140,0 mg L⁻¹ é a mais recomendada para o manejo de bettas, pois proporciona uma resposta mais rápida sem causar mortalidades. Além disso, com exposições em dias sucessivos de eugenol, a resposta ao anestésico é mais lenta.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.G.; MCKINLEY, R.S.; COLVECCHIA, M. 1997 The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17(2): 301-307.
- BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. 2012 Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(6): 1597-1602.
- BOYD, C.E. 2000 *Water quality: an introduction*. Massachusetts: Klumer Academic Press. 330p.
- DELBON, M.C. e RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2012 Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo: concentrações e administrações sucessivas. *Boletim Instituto de Pesca*, 38(1): 43-52.
- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E.W.; GREENBERG, A.E. 2005 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health Association. 1325p.
- GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R. 2001 Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(4): 426-431.
- GUÉNETTE, S.A.; UHLAND, F.C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. 2007 Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266(1-4): 262-265.
- GONÇALVES, A.F.N.; SANTOS, E.C.C.; FERNANDES, J.B.K.; TAKAHASHI, L.S. 2008 Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, 30(3): 339-344.
- GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. 2004 The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1): 46-53.
- 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 dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia sp.* *Acta Scientiarum: Animal Sciences*, 30(3): 303-307.
- INOUE, L.A.K.A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. 2003 Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33(5): 943-947.
- IWANA, G. e ACKERMAN, A. 1994 Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, T. (eds) *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, p.1-5.
- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. SOTO, C.G. 1998 The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 29(2): 89-101.

- PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.Y.; SEOL, D.W.; JINHWAN, L.; PARK, I.S. 2008 Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research*, 39(8): 877-884.
- PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; OLIVEIRA, R.H.F.; RIBEIRO, M.A.R.; COPPOLA, M.P. 2009 Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural*, 39(6): 1851-1856.
- PÉREZ-GIANESELLI, M. e FLORES-QUINTANA, C. 2009 Anestésicos usados para minimizar estrés en peces en la piscicultura. In: TAVARES-DIAS, M. (ed.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p.248-269.
- REID, S.G.; SUNDIN, L.; MILSON, W.K. 2006 The cardiorespiratory system in tropical fishes: structure, function and control. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. *The physiology of tropical fishes*. USA: Elsevier, p.225-275.
- RIBEIRO, P.A.P.; MIRANDA-FILHO, K.C.; MELILLO-FILHO, R.; SANTOS, A.E.H.; SILVA, W.S.; RODRIGUES, L.A.; LUZ, R.K. 2013 Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8): 1136-1139.
- ROSS, L.G. e ROSS, B. 2008 *Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell Science. 240p.
- ROTHWELL S.E.; BLACK, S.E.; JERRETT, A.R.; FORSTER, M.E. 2005 Cardiovascular changes and catecholamine release following anesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 140(3): 289-298.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. 2005 Eugenol as na eficaz anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11): 1056-1061.
- SIMÕES, L.N.; GOMIDE, A.T.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; GOMES, L.C. 2012 O uso de óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 34(2): 175-181.
- SLADKY, K.K.; SWANSON, C.R.; STOSKOPF, M.K.; LOOMIS, M.R.; LEWBART, G.A. 2001 Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachyomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62(2): 337-342.
- SOTO, C. e BURHANUDDIN, G. 1995 Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136(1-2): 149-152.
- VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; MACÊDO, G.R. 2006 Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 28(3): 275-279.
- VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. 2008 Eugenol como anestésico para tilápia do Nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8): 1069-1074.