



Eugenol na anestesia da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Eugenol for anesthesia of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

**Renata Maria Medeiros-Silva¹, Elvídio Landim do Rêgo Lima², Miguel Arcanjo Santos Neto²,
Humber Agrelli Andrade¹**

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife/PE, CEP: 52171-900. E-mail: eng.pescarenata@yahoo.com.br

²Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (Chesf), Recife/PE

Recebido em: 14/10/2013

Aceito em: 10/06/2014

Resumo. Neste estudo, avaliou-se a eficácia do eugenol e determinou-se a concentração ideal para induzir a anestesia da tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados trinta peixes com peso médio de 6,67 g e comprimento total médio de 7,34 cm. Os testes foram conduzidos em aquários com aeração e capacidade para 15 litros. Os animais foram expostos às concentrações de 50, 60, 70, 80 e 100 mg L⁻¹ de eugenol, e os tempos de indução e recuperação de cada peixe foram monitorados com um cronômetro digital. Os resultados obtidos mostraram que todas as concentrações testadas foram capazes de anestésiar os animais. As médias dos tempos de indução para as concentrações de 50, 60, 70, 80 e 100 mg L⁻¹ foram de 62,83, 48,85, 46,88, 43,12 e 34,28 segundos, respectivamente. Concluiu-se que, a concentração de 50 mg L⁻¹ é suficiente para induzir à anestesia desta espécie.

Palavras-chave: anestésico, indução, peixe, recuperação

Abstract. The effectiveness of eugenol and optimal concentration for the anesthetic induction of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was assessed in this paper. Thirty fish with average weight of 6.67 g and average total length of 7.34 cm were used in the experiment. The tests were carried out in aerated 15 L capacity aquariums. Animals were exposed to 50, 60, 70, 80 and 100 mg/L of eugenol concentrations and induction and recovery times of each fish were monitored with a digital stopwatch. The results showed that all concentrations tested were enough to induce the Nile tilapia. Averages of induction times for the concentrations of 50, 60, 70, 80 and 100 mg L⁻¹ were 62.83, 48.85, 46.88, 43.12 and 34.28 seconds, respectively. The conclusion is that 50 mg L⁻¹ concentration is enough to safely achieve the anesthetic induction of the specie.

Keywords: anesthetic, induction, fish, recovery

Introdução

A anestesia é uma ferramenta valiosa para minimizar o estresse ou danos físicos provocados pela captura, manipulação e soltura dos animais (Ross & Ross, 2008). Os anestésicos para peixes são geralmente administrados na água, os animais são imersos e a solução anestésica passa pelas brânquias e difunde-se para o sangue, conduzindo o fármaco até o sistema nervoso central (Ross & Ross, 2008).

Muitos produtos químicos são utilizados como anestésicos para peixes, tais como: MS-222 (triclaína metano sulfonato), benzocaína, quinaldina, fenoxietanol, dentre outros (Velasco-Santamaría, 2008; Weber, 2011; Bittencourt et al., 2013). No entanto, alguns destes fármacos podem ocasionar inconvenientes como perda do muco, irritação das

brânquias e danos na córnea (Inoue et al., 2003). Por isso, procura-se substituir esses anestésicos sintéticos por outros que não causem danos aos animais.

Um dos principais anestésicos naturais utilizados no Brasil é o óleo de cravo. Ele é extraído das folhas e dos brotos de árvores do gênero *Eugenia* (Simões & Gomes, 2009). Desde a antiguidade, o óleo de cravo tem sido usado como um leve anestésico tópico, ajudando com a dor de dente, dores de cabeça e dores nas articulações, isso porque seu princípio ativo é o eugenol, que representa 90-95% da composição deste óleo. (Bowser, 2001; Ross & Ross, 2008).

O eugenol é muito utilizado na odontologia como um produto de uso interno, sendo um



componente (misturado ao óxido de zinco) de preenchimentos temporários para restaurações (Inoue et al., 2003). Atualmente vem sendo utilizado como anestésico de peixes em vários países por possuir uma série de vantagens, dentre elas a econômica (Iversen, 2003). Também possui grande eficácia, ampla margem de segurança para o animal e ausência de toxicidade para o operador nas doses utilizadas para os peixes (Keene et al., 1998). No entanto, pesquisas feitas em ratos de laboratório, coelhos e gatos, revelam que o eugenol, sem diluições, ao entrar em contato com a pele causa inflamação local e necrose celular (Feng & Lipton, 1997).

Substâncias anestésicas são utilizadas, no intuito de diminuir a mobilidade dos animais e consequentemente minimizar as lesões dos peixes e do manipulador decorrentes dos procedimentos de biometria, transporte, extrusão de gametas, marcação, entre outras. A tilápia nilótica, por exemplo, apresenta espinhos ósseos nas nadadeiras que podem provocar ferimentos aos que as manuseiam, assim o uso de anestésicos durante o manejo reduz o estresse do animal e aumenta a segurança do manipulador (Melo et al., 2012).

A tilápia ocupa o primeiro lugar da aquicultura continental brasileira, contribuindo com 46,61% do total produzido (MPA, 2011). Esse lugar de destaque deve refletir em pesquisas que venham contribuir no processo produtivo desta espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do eugenol e determinar a concentração ideal para induzir a anestesia da espécie *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), pertencente à Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF). Os peixes provenientes de um viveiro desta estação foram aclimatados durante 7 dias em tanque de 16000 litros com circulação contínua de água. A temperatura durante esta fase variou de 23 a 25 °C e a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do experimento.

O eugenol (Biodinâmica[®]) é um óleo, por isso foi dissolvido primeiramente em um solvente orgânico para depois ser misturado em água. Utilizou-se etanol (92,8° INPM) na proporção de

1:10 para diluir o produto, resultando em uma solução-estoque à concentração de 100 mg mL⁻¹.

Os testes foram conduzidos em dois aquários de vidro, um para a indução e o outro para a recuperação, cada um contendo 10 litros de água e aeração constante.

Os peixes foram individualmente expostos as concentrações de 50, 60, 70, 80 e 100 mg L⁻¹ de eugenol. Utilizou-se um total de 30 animais (seis por tratamento) escolhidos aleatoriamente. Os ensaios ocorreram da menor para a maior concentração. Ao entrarem no estado de latência, os peixes eram removidos do aquário de indução (com eugenol), medidos (comprimento total = 7,34 ± 0,40 cm), pesados (peso = 6,67 ± 1,13 g) e transferidos para o aquário de recuperação (sem eugenol). A água do aquário de indução e recuperação foi trocada ao término de cada repetição. Logo após, o grupo de peixes de cada concentração foi colocado em tanques de 840 litros durante 24 horas para avaliar a sobrevivência.

O critério utilizado para estabelecer o estado de anestesia (latência) foi a ausência de reação a estímulos realizados, estágio 4 conforme a metodologia proposta por Woody et al. (2002) (Tabela 1). A chegada a este estágio era verificada com o auxílio de um bastão de vidro. Os animais foram dados como recuperados quando readquiriam a capacidade normal de natação, conforme a mesma metodologia. Utilizou-se cronômetro digital para registrar os tempos de indução e recuperação de cada peixe.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com um fator, a concentração de eugenol. Para investigar com maior detalhe eventuais diferenças de respostas utilizou-se o teste Tukey. Um modelo potencial também foi utilizado para descrever o tempo de indução em função das concentrações de eugenol. Os parâmetros do modelo foram estimados através de regressão linear. Todas as análises foram realizadas com o programa R (Ihaka & Gentleman, 1996).



Tabela 1. Estágios de anestesia e as respectivas características comportamentais.

Estágio	Características comportamentais
1	Movimento opercular torna-se lento ou irregular
2	Perda de equilíbrio e dificuldade para manter a posição vertical de nado
3	Perda total do equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado
4	Nenhuma reação a estímulos
Recuperação	Capacidade de se manter na posição vertical e de nadar normalmente

Resultados e Discussão

Para todas as unidades experimentais, a água apresentou as seguintes características físico-químicas: temperatura de $24 \pm 0,95$ °C, oxigênio dissolvido (OD) de $6,0 \pm 0,81$ mg L⁻¹, pH de $9,0 \pm 0,72$, condutividade de 81 ± 1 mS cm⁻¹ e os sólidos totais dissolvidos (TDS) de $0,052$ g L⁻¹, única variável constante. Não houve diferenças estatísticas entre as concentrações para cada um dos parâmetros.

Todas as concentrações testadas (Tabela 2) foram capazes de induzir a tilápia-do-nilo ao estágio 4 de anestesia (Woody et al., 2002), caracterizada pela ausência de reação a estímulos, ou seja, o peixe repousa no fundo do aquário inclina-se para um dos lados devido à perda do equilíbrio e não responde a estímulos externos, mantendo constante o batimento do opérculo.

Não houve mortalidade de animais durante a exposição ao anestésico e nem durante o descanso (24 horas contadas após o experimento) dos animais. De acordo com Cho & Helth (2000), o eugenol é rapidamente eliminado pelo animal, sem a necessidade de depuração. No entanto, outros estudos mostram que a utilização com administrações sucessivas de eugenol gera acumulação no organismo do animal (e.g. Guénette et al., 2007). E testes de análise sensorial realizados em filés de jundiá, após a anestesia, demonstraram que o óleo de cravo deixa um sabor desagradável ao filé (Cunha, 2007). No entanto, segundo Delbon & Paiva (2012) o resíduo anestésico do eugenol, para esta mesma espécie, é eliminado do organismo do peixe em até 24 horas.

Tabela 2. Tempos de indução e recuperação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Concentração (Mg L ⁻¹)	Indução (s)	Recuperação (s)
50	62,83 ± 6,73 a*	219,22 ± 57,84 a
60	48,85 ± 8,22 b	140,60 ± 23,55 b
70	46,88 ± 9,31 b	155,85 ± 26,41 ab
80	43,12 ± 5,84 bc	197,63 ± 29,71 ab
100	34,28 ± 3,93 c	229,32 ± 60,48 a

*Médias na mesma coluna seguidas de letras distintas diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Todos os tratamentos, tanto a indução quanto a recuperação, não passaram de 3 e 5 minutos, respectivamente. Segundo Roubach & Gomes (2001) o anestésico é considerado satisfatório quando a indução não ultrapassa 3 minutos e a recuperação ocorre dentro de 5 minutos.

No caso da indução, verificou-se que a resposta ao anestésico no tratamento de 50 mg L⁻¹ apresentou média diferente das demais observadas para os outros tratamentos (Tabela 2). Resultado similar também foi encontrado por Vidal et al. (2008) para a mesma espécie. No entanto, para o dourado (*Salminus brasiliensis*) não se observou diferença entre as concentrações de 50 e 60 mg L⁻¹

de eugenol (Hisano et al., 2008). As diferenças entre as concentrações são relevantes para o estudo dos efeitos das doses a serem administradas, pois se pretende encontrar uma concentração suficiente e segura para induzir os peixes.

Observou-se que o tempo de indução à anestesia é influenciado pela concentração do anestésico. Segundo Park et al. (2008) maiores concentrações de fármaco resultam em menor tempo de indução. Outra observação parece estar relacionada ao tamanho do peixe (Figura 1), pois para uma mesma concentração do anestésico o animal que apresenta maior peso demora mais tempo para chegar ao estágio 4 (Tabela 1) de anestesia.

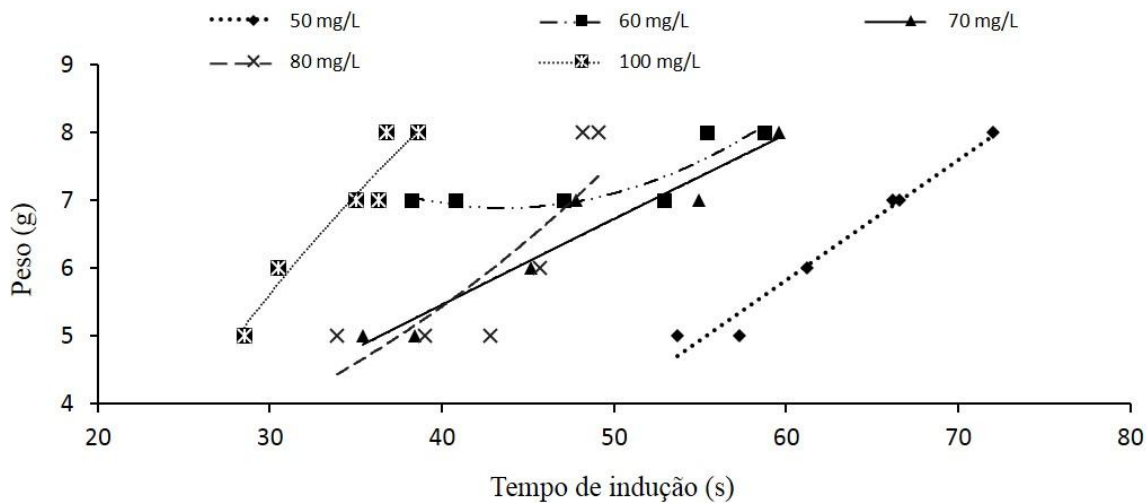


Figura 1. Peso da tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) em função do tempo de indução dos animais expostos ao eugenol.

Neste trabalho observou-se que o aumento da concentração deste fármaco exige um acréscimo no tempo de recuperação do animal, exceto para a concentração de 50 mg L⁻¹ que apresentou o segundo maior tempo de recuperação. O fato do aumento da concentração demandar um maior tempo de recuperação também foi observada para o pampo (*Trachinotus marginatus*) (Okamoto et al., 2009), o matrinxã (*Brycon cephalus*) (Vidal et al., 2007) e a carpa (*Cyprinus carpio*) (Hajek et al., 2006).

Os coeficientes de variação (CV) (Figura 2), tanto na indução quanto na recuperação, não demonstraram um padrão. Esse mesmo comportamento também foi observado no trabalho de Hisano et al. (2008), cujas concentrações variavam de 20 a 60 mg L⁻¹ de eugenol. Já o trabalho de Vidal et al. (2007) apresentou uma uniformidade nos resultados do CV de indução e recuperação, para concentrações maiores que 100 mg L⁻¹. Em Vidal et al. (2008) essa uniformidade só ocorreu para o CV de indução, também para concentrações maiores de 100 mg L⁻¹. Assim conclui-se que para concentrações maiores que 100 mg L⁻¹ os coeficientes de variação tendem a se

estabilizar, isso ocorre porque a proporção entre o desvio padrão e a média das respostas diminuem com o aumento das concentrações principalmente quando ultrapassam esta concentração.

Comparando-se o coeficiente de variação médio de indução e recuperação, observou-se que o primeiro (14,48) foi menor que o segundo (20,30), esse padrão também foi encontrado para matrinxã (*Brycon cephalus*) (Inoue et al., 2003), dourado (*Salminus brasiliensis*) (Hisano et al., 2008), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Roubach et al., 2005) e tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) (Vidal et al., 2008). Isto implica que a variabilidade das respostas de recuperação é maior que a de indução.

A equação potencial (Eq. 1), obtida a partir da curva do gráfico da Figura 3, descreve razoavelmente bem a relação entre tempo de indução e a concentração de eugenol.

$$T = 1407,855 \cdot (C)^{-0,806} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: T - tempo de indução; C - concentração do eugenol.

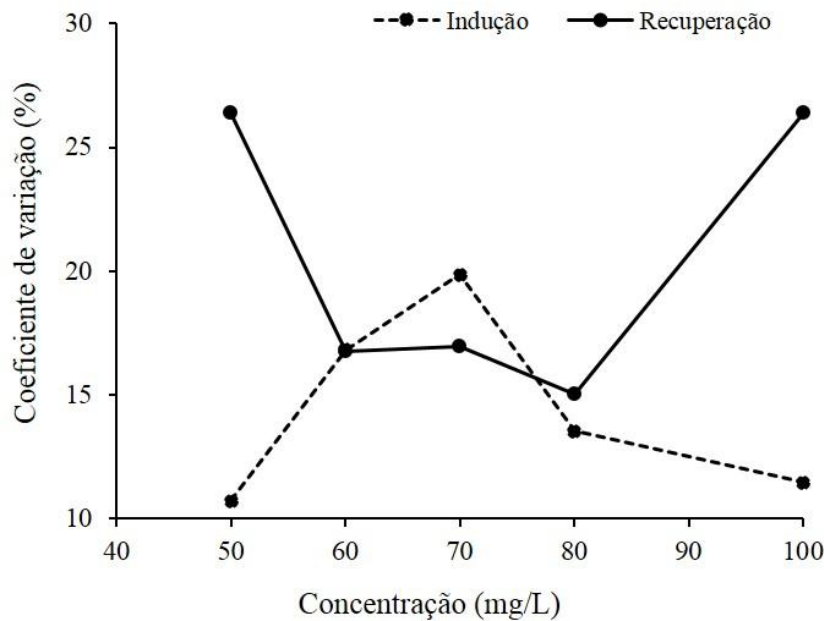


Figura 2. Coeficiente de variação de indução e recuperação em função da concentração de eugenol em experimento com tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Comparando-se o coeficiente de variação médio de indução e recuperação, observou-se que o primeiro (14,48) foi menor que o segundo (20,30), esse padrão também foi encontrado para matrinxã (*Brycon cephalus*) (Inoue et al., 2003), dourado (*Salminus brasiliensis*) (Hisano et al., 2008), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Roubach et al., 2005) e tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Vidal et al., 2008). Isto implica que a variabilidade das respostas de recuperação é maior que a de indução.

A equação potencial (Eq. 1), obtida a partir da curva do gráfico da Figura 3, descreve razoavelmente bem a relação entre tempo de indução e a concentração de eugenol.

$$T = 1407,855 \cdot (C)^{-0,806} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: T - tempo de indução; C - concentração do eugenol.

O coeficiente de determinação (R^2) para a forma linearizada é de 0,64. O modelo potencial também foi utilizado nos trabalhos de Inoe et al. (2003), Vidal et al. (2007) e Vidal et al. (2008). O R^2 é menor que o obtido no trabalho de Vidal et al. (2008), também para a espécie *Oreochromis*

niloticus. Uma possível explicação diz respeito ao amplo intervalo de concentrações de eugenol (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹) utilizadas por Vidal et al. (2008). No presente trabalho a concentração máxima de 100 mg L⁻¹ não foi suficiente para obter um alto coeficiente de determinação, pois percebe-se que quanto maior a concentração do anestésico menor a diferença do tempo de indução entre as repetições do tratamento, ou seja, menor a variância da resposta (Figura 3). Como Vidal et al. (2008) utilizaram concentrações maiores que 100 mg L⁻¹ para as quais a variância é reduzida, obtiveram um coeficiente de determinação maior ao ajustar o modelo.

A concentração de 50 mg L⁻¹ de eugenol foi suficiente para induzir de maneira segura a tilápia-do-nilo, em aproximadamente um minuto. Resultados similares também foram encontrados em estudos com matrinxã (Vidal et al., 2007), truta arco-íris (Keene et al., 1998) e dourado (Hisano et al., 2008). No entanto, deve-se considerar que o fármaco foi utilizado para anestésiar os peixes individualmente. Cenários com diferentes densidades podem resultar em diferenças quanto ao tempo de indução e recuperação.

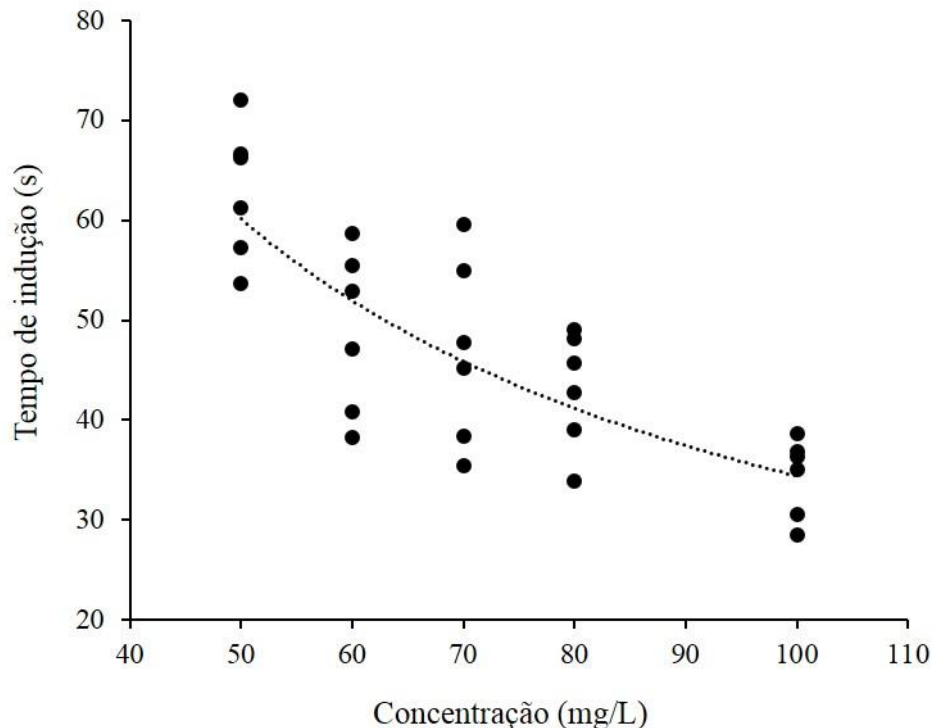


Figura 3. Tempos de indução em função da concentração de eugenol em experimento com tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Durante a realização do experimento, observou-se um comportamento hiperativo dos peixes ao entrarem em contato com o anestésico, que segundo Collins (1985) é o primeiro comportamento de um animal que será submetido à anestesia geral. Tal hiperatividade também foi observada por Vidal et al. (2007) e Mylonas et al. (2005). Grush et al. (2004) analisaram os efeitos do etanol expondo a espécie *Danio rerio* à solução de 1400 ppm de etanol por 96 horas, e observaram que não houve alterações comportamentais nos peixes. Portanto, a reação de hiperatividade parece estar ligada ao próprio fármaco.

Vidal et al. (2008) estudaram a mesma espécie (*Oreochromis niloticus*), no entanto, observou-se que para as mesmas concentrações, os animais foram anestesiados mais rapidamente no presente estudo. Possíveis explicações podem ser levantadas, tal como o jejum de 24 horas que os peixes foram submetidos neste trabalho, a diferença na metodologia utilizada para verificar os estágios de indução e recuperação, as características físico-químicas da água. E segundo Gilderhus & Marking (1987), a observação dos diferentes estágios de anestesia para peixes é bastante subjetiva podendo divergir nos resultados. Outros efeitos também devem ser considerados, de acordo com Hoskonen

& Pirhonen (2004) as concentrações ideais, segundo a farmacocinética do anestésico, dependem da biologia da espécie e da qualidade da água, particularmente dureza, salinidade e temperatura (há redução no tempo de indução com a elevação desta) (Ackerman et al., 2012; Walsh & Pease, 2002). Sendo assim, estes fatores devem ser considerados em experimentos e comparações entre estudos sobre uso de fármacos em peixes.

Conclusões

A concentração de 50 mg L⁻¹ de eugenol foi suficiente para induzir a tilápia-do-nilo. No entanto, considerando os tempos de indução e recuperação a concentração de 60 mg/L seria uma melhor opção para a anestesia desse animal.

Agradecimentos

À Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (Chesf) pelo financiamento. E aos funcionários da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA) pela assistência dada durante a execução deste trabalho.

Referências

ACKERMAN, P.A.; MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Anesthetics. Disponível em:



- http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Add_PDFs/Fish_Anesthetics.pdf. Acesso em: 10/06/2012.
- BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; NEU, D.H.; RORATO, R.R.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Eugenol e benzocafina como anestésicos para juvenis de *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (carpa comum). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, vol.8, n.1, p.163-167, 2013.
- BOWSER, P.R. Anesthetic options for fish, 1991. Disponível em: <http://docentes.esa.ipcb.pt/amrodrig/anestesia.pdf>. Acesso em 10 de junho de 2012.
- CHO, G.K; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.31, n.6, p.537-546, 2000.
- COLLINS, V.J. Princípios de anestesiologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 1194 p.
- CUNHA, M.A.. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. 2007, 65 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- FENG, J.; LIPTON, J.M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. **Neuropharmacology. Research Support**, v.26, n.12, p.1775-1778, 1987.
- GILDERHUS, P.A.; MARKING, L.L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **Journal of Fisheries Management**, v.7, n.2, p.288-292, 1987.
- GRUSH, J.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D. The Efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, v.1, n.1, p.46-53, 2004.
- GUÉNETTE, S.A.; UHLAND, F.C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, n.1, p.262-265, 2007.
- HAJEK, G.J.; KEYSZEJKO, B.; DZIAMAN, R. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.36, n.2, p.93-97, 2006.
- HISANO, H.; ISHIKAWA, M.M.; FERREIRA, R.A.; BULGARELLI, A.L.A.; COSTA, T.R.; PÁDUA, S.B. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.30, n.3, p.303-307, 2008.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperatura effects of anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v.64, v.1, p.1136-1142, 2004.
- IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: a language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v.5, n3, p.299-314, 1996.
- INOUE, L.A.K.A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Revista Ciência Rural**, v.33, n.5, p.943-947, 2003.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; McKinley, R.S.; ELIASSEN, R.A. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v.221, p.549-566, 2003.
- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, n.2, p.89-101, 2008.
- MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br>. Acesso em: 23/03/2014.
- MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v.246, n.1, p.467-481, 2005.



- OKAMOTO, M.H.; TESSER, M.B.; LOUZADA, L.R.; SANTOS, R.A.; SAMPAIO, L.A. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Revista Ciência Rural**, v.39, n.3, p.866-870, 2009.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3. ed. Oxford: Blackwell Science., 2008. 228p.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.11, n.66, p.37-40, 2001.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, n.11, p.1056-1061, 2005.
- SIMÕES, L.N.; GOMES, L.C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.3, p.613-620, 2009.
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y.; PALACIOS-RUIZ, C.; CRUZ-CASALLAS, P. Eficiência anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaina, quinaldina y metassulfonato de tricaina en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista MVZ Cordoba**, v.13, n.3, p.1435-1445, 2008.
- VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SILVA, L.C.R.; SANTOS, L.D.; SOUZA, S.R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.335-342, 2007.
- VIDAL, L.O.V.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1073, 2008.
- WEBER, R.A.; PÉREZ-MACEIRA, J.J.; PELETEIRO, J.B.; GARCÍA-MARTÍN, L.; ALDEGUNDE, M. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v.321, n.1-2, p.108-112, 2011.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v.60, n.2, p.340-347, 2002.