

Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari

Anesthetic effect of clove oil on lambari

Elyara Maria Pereira-da-Silva^{I*} Ricardo Henrique Franco de Oliveira^{II}
Maria Angélica Rosa Ribeiro^{III} Milena Pereira Coppola^{II}

RESUMO

Para avaliar o efeito anestésico do óleo de cravo em lambaris (*Astyanax altiparanae*), cinco grupos de 30 alevinos ($0,6 \pm 0,1g$) foram expostos às concentrações de 50, 75, 100, 125 e $150mg L^{-1}$, medindo-se, respectivamente: tempo de indução à anestesia profunda (caracterizada pela perda de equilíbrio, pela ausência de natação, pela redução dos movimentos operculares e pelas respostas apenas a estímulos táteis mais intensos), tempo de recuperação e taxa de mortalidade após a exposição. Em uma segunda etapa (10 peixes/tratamento), registraram-se, para cada concentração, os tempos de indução e de recuperação após anestesia cirúrgica (movimentos operculares lentos e irregulares e perda de reações a estímulos), anotando-se a mortalidade após seis minutos de exposição. Observou-se redução linear no tempo de indução à anestesia ($0,01min mg^{-1}$ de anestésico acrescido) e aumento quadrático do tempo de recuperação com a elevação da concentração (resposta máxima estimada em 7,1 minutos). A anestesia profunda foi alcançada em tempo inferior a 1,5 minuto para todas as concentrações, com recuperação mais rápida e sem mortalidade para $50mg L^{-1}$. Para indução à anestesia cirúrgica, foram registrados menores tempos nas concentrações 75 e $100mg L^{-1}$; porém, com mortalidade de 80% e 100%, respectivamente. A concentração $50mg L^{-1}$ promoveu anestesia cirúrgica e recuperação em $3,29 \pm 0,71$ e $4,97 \pm 0,63$ minutos, respectivamente, sem mortalidade. Concluiu-se que o óleo de cravo possui efeito anestésico para alevinos de lambari, sendo $50mg L^{-1}$ a concentração eficiente e segura para indução à anestesia profunda em até 1,5 minuto e de anestesia cirúrgica em até 3,3 minutos de exposição.

Palavras-chave: eugenol, *Astyanax altiparanae*, manejo, anestesia.

ABSTRACT

The anesthetic effect of clove oil on lambari (*Astyanax altiparanae*) was evaluated by exposing five groups of 30 fry ($0.6 \pm 0.1g$) to concentrations of 50, 75, 100, 125 and $150mg L^{-1}$ and measuring the induction time to deep anesthesia (characterized by loss of equilibrium, absence of swimming, reduction of opercular movements, and responses only to intense tactile stimuli), recovery time, and mortality rate after exposure. Another phase of the experiment (10 fish/treatment) involved recording the induction time and recovering after surgical anesthesia (slow irregular opercular movements and loss of reaction to stimuli), and mortality rates after six minutes of exposure to each concentration of clove oil. Induction time decreased linearly (0.01 minute for each mg of additional anesthetic) and recovery time increased quadratically as the concentration increased (maximum estimated response in 7.1 minutes). Deep anesthesia occurred in less than 1.5 minute at all the concentrations, with faster recovery and zero mortality at $50mg L^{-1}$. The fastest induction to deep anesthesia occurred at concentrations of 75 and $100mg L^{-1}$, but resulted in mortality rates of 80% and 100%, respectively. The $50mg L^{-1}$ concentration resulted in surgical anesthesia in 3.29 ± 0.71 minutes and recovery in 4.97 ± 0.63 minutes, without mortality. It was concluded that clove oil has an anesthetic effect on lambari and that $50mg L^{-1}$ is an efficient and safe concentration for inducing deep anesthesia in up to 1.5 minute and surgical anesthesia in up to 3.3 minutes of exposure.

Key words: eugenol, *Astyanax altiparanae*, handling, anesthesia.

^IFaculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil. E: mail: elyara@usp.br. *Autor para correspondência.

^{II}Anhanguera Educacional, Leme, SP, Brasil.

^{III}Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade (ICMBIO), Pirassununga, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Os anestésicos são produtos importantes utilizados para facilitar o manejo e, possivelmente, reduzir o estresse em animais terrestres e aquáticos, especialmente peixes, tanto na pesquisa, quanto em práticas rotineiras no campo (SMALL, 2003 e 2004). Caracterizam-se como agentes farmacológicos capazes de conduzir esses animais a um estado de perda parcial ou completa da percepção dos estímulos externos, comprometendo a capacidade de restabelecimento da postura normal de nado na coluna de água (SUMMERFELT & SMITH, 1990; IWAMA & ACKERMAN, 1994).

Apesar da anestesia aparentemente minimizar o impacto de agentes estressores, é importante a determinação de concentrações ótimas de fármacos com características anestésicas para se evitar os efeitos negativos da prática, pois a utilização de quantidade excessiva de anestésicos pode promover alterações metabólicas detectadas somente horas após a exposição, ou ainda a morte dos peixes (SUMMERFELT & SMITH, 1990; PARK et al., 2008).

A concentração necessária para indução à anestesia varia de acordo com a espécie e está relacionada à tolerância e ao tempo de recuperação (SUMMERFELT & SMITH, 1990). Segundo PARK et al. (2008), quanto maior a concentração utilizada, menor o tempo para indução à anestesia, havendo também uma relação inversa entre esse tempo e a recuperação. O tempo de indução à anestesia pode também ser afetado pela temperatura da água (WALSH & PEASE, 2002), pelo gênero e pelo tamanho do peixe (WOODY et al., 2002).

A eficácia e a segurança de qualquer anestésico variam entre as espécies, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (KING et al., 2005). De acordo com os critérios de eficiência recomendados por MARKING & MEYER (1985) e ROSS & ROSS (2008), um anestésico deve ser eficaz em baixas concentrações e apresentar toxicidade em doses muito superiores às efetivas. Sua escolha baseia-se nos critérios de disponibilidade, custo, facilidade de utilização, natureza do estudo e segurança para o usuário e ambiente, características essenciais encontradas no óleo de cravo (IVERSEN et al., 2003).

O óleo de cravo é extraído do caule, das flores e das folhas das espécies *Eugenia caryophyllata* e *E. aromatica*, e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), considerado seguro para humanos, animais e ambiente. O eugenol é utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e como agente analgésico, antibacteriano, antifúngico,

antiviral e anestésico local na odontologia (KEENE et al., 1998; GRIFFITHS, 2000; ROSS & ROSS, 2008). De acordo com YANG et al. (2003), o eugenol provoca depressão do sistema nervoso central por meio da interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-amino-butírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).

A eficiência e segurança do óleo de cravo para anestesia são descritas na literatura para várias espécies de peixes, tanto para o manejo nas condições de criação intensiva, quanto nas pesquisas em laboratório (DERIGGI et al., 2006; GUÉNETTE et al., 2007; RIBAS et al., 2007). Em relação aos peixes tropicais nativos do Brasil, INOUE et al. (2003 e 2005) verificaram características anestésicas do óleo de cravo em juvenis de matrinxãs (*Brycon cephalus*). Apesar do grande número de trabalhos relacionados ao emprego do óleo de cravo como anestésico para peixes, nenhuma referência é feita aos peixes do gênero *Astyanax*, a exemplo do *A. altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000), conhecido como “lambari do rabo amarelo”, cuja distribuição abrange a Bacia do Rio Paraná.

Essa espécie se destaca como uma das mais resistentes aos impactos ambientais por apresentar hábito onívoro, ovos reduzidos e de rápido desenvolvimento e êxito na ocupação de diferentes ambientes, sendo ainda um importante elo da cadeia trófica por servir de alimento para peixes de maior porte e também para o consumo humano (LEUZZI et al., 2004; DIAS et al., 2005). Apresenta, como a maioria dos peixes, aumento da mobilidade durante práticas como biometria, raspagens de muco e transporte, tornando-se desejável a utilização de anestésicos que auxiliem na redução da ocorrência de ferimentos que podem resultar em doenças ou morte pós-manejo (INOUE et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anestésico do óleo de cravo e a concentração eficaz e segura deste na indução à anestesia profunda e cirúrgica em alevinos de lambaris.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 200 alevinos de lambaris (*Astyanax altiparanae*), com massas corpóreas semelhantes ($0,59 \pm 0,08$ g) e provenientes de desova induzida realizada no Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBIO, Pirassununga, São Paulo. Inicialmente os peixes foram estocados em caixa de fibra de vidro (250L) durante 15 dias, visando à aclimação às condições laboratoriais

em temperatura de 22°C, fotoperíodo de 12 horas e aeração contínua. Os parâmetros indicadores da qualidade da água (temperatura, pH e concentrações de amônia, nitrito e oxigênio) foram monitorados continuamente, e o alimento consistiu em ração comercial farelada contendo 32% de proteína bruta oferecida a lanço duas vezes ao dia, na proporção de 2% da biomassa.

O óleo de cravo extraído de folhas de *Eugenia* sp. (1000mg L⁻¹ – VIAFARMA Lote 010742 PM) e obtido em farmácia de manipulação foi primeiramente diluído (1:20) em etanol 100% (Synth - Lote 111025), de forma a reduzir o seu caráter hidrofóbico. A solução estoque alcoólica obtida (50mg L⁻¹) foi então diluída em 300mL de água contidos em uma unidade de anestesia (cuba de vidro medindo 10 x 7 x 6cm), em quantidades necessárias para obtenção das concentrações 50, 75, 100, 125 e 150mg L⁻¹, estabelecidas em estudos preliminares que revelaram a ineficácia da concentração de 25mg L⁻¹ para indução à anestesia profunda nos alevinos, em até quatro minutos de exposição, ou seja, a dose mínima necessária para indução à anestesia foi de 50mg L⁻¹.

Os critérios para avaliação dos estágios de indução e de recuperação após exposição ao óleo de cravo, apresentados na tabela 1, foram modificados de acordo com ROSS & ROSS (2008), VIDAL et al. (2008) e PARK et al. (2008).

Após jejum de 12 horas, os peixes foram rapidamente capturados no tanque de aclimação e transferidos individualmente para a unidade de anestesia. Nesta, foram observados os efeitos do óleo de cravo pela avaliação do comportamento dos animais, sendo ainda medido o tempo necessário para

estabelecimento do estágio 3 de indução à anestesia, denominado “anestesia profunda” e caracterizado pela perda total do equilíbrio, pela ausência de movimento das nadadeiras e de natação, pelos movimentos operculares reduzidos e pelas respostas apenas aos estímulos táteis mais intensos (Tabela 1). Enquanto anestesiado, cada peixe foi rapidamente pesado, medido e transferido para uma unidade de recuperação (um aquário com capacidade de 10L), contendo água isenta do óleo de cravo com aeração contínua. Na unidade de recuperação, foi registrado o tempo para estabelecimento do estágio 4 de recuperação à anestesia profunda (restabelecimento total do equilíbrio, dos movimentos operculares e da natação). Durante 96 horas após os testes, foram registradas as taxas de mortalidade dos peixes submetidos a cada concentração do anestésico.

Na segunda etapa do trabalho, que teve como objetivo avaliar a segurança do óleo de cravo e a resistência dos alevinos de *A. altiparanae* ao mesmo tempo, foi empregada a mesma metodologia. Foram anotados os tempos de indução à anestesia e recuperação, bem como a taxa de mortalidade após exposição durante seis minutos a todas as concentrações (o dobro do tempo registrado para indução à anestesia cirúrgica, na primeira etapa, utilizando-se a menor concentração do anestésico), o que resultou na indução ao estágio 4 (anestesia cirúrgica), caracterizado por movimentos operculares lentos e irregulares e perda total de reação a estímulos táteis e visuais. Esse tempo também correspondeu ao dobro do limite ideal de três minutos preconizado por MARKING & MEYER (1985), para indução à anestesia cirúrgica.

Tabela 1 - Critérios de indução à anestesia e de recuperação utilizados para determinação da eficácia do óleo de cravo como anestésico em alevinos de lambari (*Astyanax altiparanae*).

Estágios de Indução	Comportamentos observados
Pré-indução	Movimentos operculares e de natação normais.
1	Aumento pronunciado dos movimentos de natação de um lado para outro, sem perda do equilíbrio.
2	Perda parcial do equilíbrio e natação errática.
3	Anestesia profunda: perda total do equilíbrio, ausência de movimento das nadadeiras e de natação, movimentos operculares reduzidos e respostas apenas aos estímulos táteis mais intensos.
4	Anestesia cirúrgica: movimentos operculares lentos e irregulares, perda total de reação a estímulos táteis e visuais.
Estágios de recuperação	
1	Aumento dos movimentos operculares e início de movimentação de nadadeiras.
2	Início de natação errática sem estabelecimento de equilíbrio.
3	Recuperação parcial do equilíbrio e dos movimentos de natação.
4	Recuperação total do equilíbrio e dos movimentos operculares e de natação.

Modificado de PARK et al. (2008), ROSS & ROSS (2008) e VIDAL et al. (2008).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional, com posterior estudo de regressão buscando estabelecer as curvas dos tempos de indução e recuperação à anestesia profunda em função das diferentes concentrações do óleo de cravo. Os tempos médios de indução e de recuperação à anestesia cirúrgica foram comparados pelo teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água foi mantida em condições semelhantes entre a caixa de aclimação dos peixes, a unidade de anestesia e a unidade de recuperação à anestesia, registrando-se temperatura média de $22,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$, pH de $6,8 \pm 0,2$, oxigênio dissolvido $4,8 \pm 0,4\text{mg L}^{-1}$ e concentrações de amônia e de nitrito inferiores a $0,04\text{mg L}^{-1}$ e $0,1\text{mg L}^{-1}$, intervalos considerados adequados para a manutenção de espécies de peixes tropicais (VINATEA, 2004).

Os tempos de indução e de recuperação à anestesia podem ser afetados por variáveis relacionadas à qualidade da água. PARK et al. (2008) verificaram que estes foram reduzidos pelo aumento da temperatura em peixes da espécie *Epinephelus bruneus* e, de acordo com HOSKONEN & PIRHONEN (2004), temperaturas mais elevadas aceleram o metabolismo, reduzindo o tempo de recuperação à anestesia. Porém, as respostas observadas no presente trabalho, após exposição dos peixes às diferentes concentrações do anestésico, não podem ser atribuídas a essa variável que foi mantida constante durante todo experimento.

O óleo de cravo provocou alterações de comportamento características da indução à anestesia profunda em tempo inferior a 1,5 minuto para as concentrações 50, 75 e 100mg L^{-1} e inferior a um minuto para 125 e 150mg L^{-1} ; porém, com uma taxa de mortalidade de 15%, para a maior concentração (Tabela 2).

Os tempos de indução à anestesia profunda registrados para as concentrações de 50 e 75mg L^{-1} foram semelhantes aos obtidos por INOUE et al. (2003) para juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*), com peso aproximado de 50 gramas. Concentrações entre 40 e 60mg L^{-1} de óleo de cravo promoveram anestesia profunda em tempo inferior a um minuto em juvenis de *Oncorhynchus mykiss*, com aproximadamente 20 gramas (KEENE et al., 1998). A semelhança entre os tempos de indução à anestesia profunda obtidos no presente trabalho, cujos peixes apresentavam reduzida massa corpórea ($0,6 \pm 0,1\text{g}$), e os registrados para outras espécies, de maior porte e fase mais tardia do desenvolvimento, demonstra a interferência de fatores específicos e sugere maior resistência dos alevinos de lambari à indução anestésica pelo óleo de cravo.

O tempo de recuperação após indução à anestesia profunda foi inferior a 10 minutos para todas as concentrações (Tabela 2), limite máximo considerado por GILDERHUS & MARKING (1987), SON et al. (2001) e PARK et al. (2003). O menor tempo de recuperação à anestesia profunda foi observado para as concentrações de 50mg L^{-1} e 75mg L^{-1} .

As curvas de regressão ajustadas para o tempo de indução à anestesia profunda e recuperação (Figura 1) indicam redução linear no tempo de indução (0,01 minuto por mg de anestésico acrescido) e aumento quadrático do tempo de recuperação com a elevação da concentração (resposta estimada em 7,1 minutos). De fato, quanto menor o tempo de indução à anestesia, maior é o tempo de recuperação dos peixes (PARK et al., 2008).

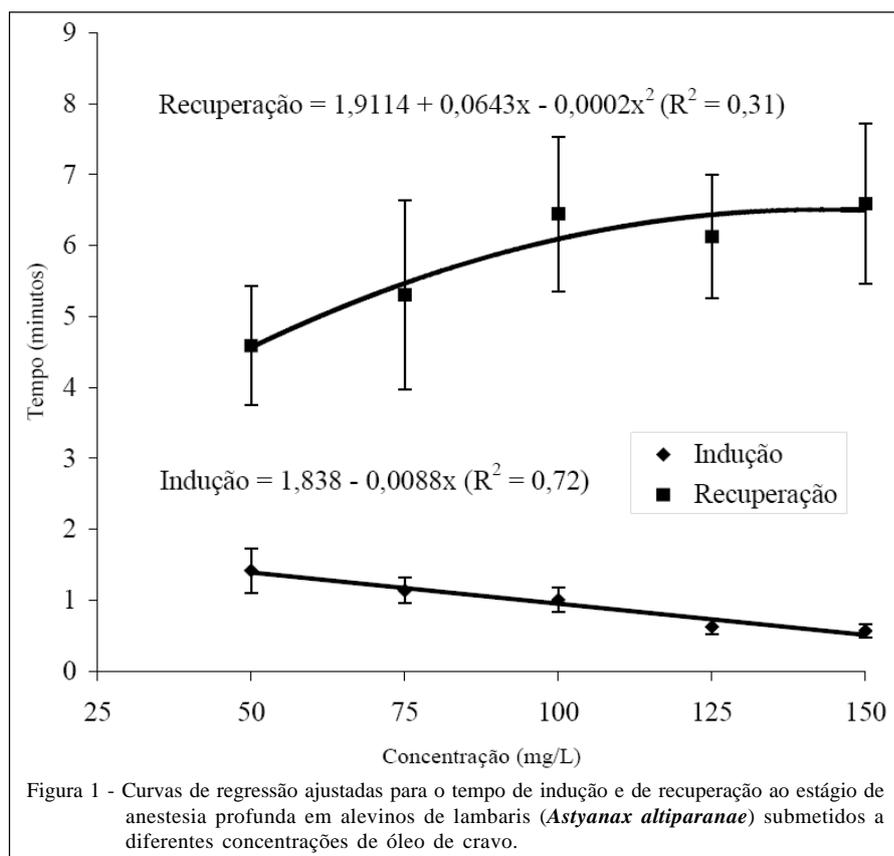
Os dados relacionados ao tempo de indução e recuperação à anestesia cirúrgica e as taxas de mortalidade após seis minutos de exposição às diferentes concentrações de óleo de cravo são, também, expressos na tabela 2. Os menores tempos de indução (<2 minutos) foram registrados para as concentrações

Tabela 2 - Tempos de indução à anestesia e de recuperação (minutos) e taxas de mortalidade (TM) observados em alevinos de lambaris (*Astyanax altiparanae*) submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo, para indução ao estágio de anestesia profunda e cirúrgica (exposição de seis minutos).

Conc. mg L ⁻¹	-----Anestesia Profunda-----			-----Anestesia Cirúrgica-----		
	Indução	Recuperação	TM (%)	Indução	Recuperação	TM (%)
50	$1,46 \pm 0,37^a$	$4,59 \pm 0,84^a$	0	$3,29 \pm 0,71^a$	$4,97 \pm 0,63^a$	0
75	$1,14 \pm 0,18^b$	$5,31 \pm 1,34^a$	0	$1,89 \pm 0,64^b$	$7,50 \pm 1,19^b$	80
100	$1,01 \pm 0,17^{bc}$	$6,48 \pm 1,09^{bc}$	0	$1,71 \pm 0,58^b$	-	100
125	$0,63 \pm 0,09^{cd}$	$6,13 \pm 0,87^c$	0	*	*	*
150	$0,57 \pm 0,1^d$	$6,59 \pm 1,13^c$	15	*	*	*

Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey (P<0,05).

* Ensaios não realizados devido à mortalidade de 100% observada após exposição à concentração de 100mg L^{-1} .



de 75 e 100mg L⁻¹; porém, com mortalidade de 80% e 100%, respectivamente. Os testes referentes às concentrações de 125 e 150mg L⁻¹ não foram realizados devido à taxa de mortalidade de 100% observada no ensaio para a concentração de 100mg L⁻¹ (Tabela 2).

A menor concentração testada (50mg L⁻¹) induziu os peixes à anestesia cirúrgica em 3,29±0,71 minutos, sem mortalidade após seis minutos de exposição e com recuperação após 4,97±0,63 minutos. Esse tempo de recuperação foi semelhante ao registrado para a anestesia profunda na primeira etapa do trabalho, em que o tempo de exposição ao anestésico foi menor.

PARK et al. (2008) registraram para essa mesma concentração de óleo de cravo um menor tempo de indução (1,06 minuto) e de recuperação (0,31 minuto); porém, para uma outra espécie (*Epinephelus bruneus*) e utilizando exemplares de maior peso (100g). Os maiores tempos de indução à anestesia cirúrgica registrados no presente trabalho, cujos peixes apresentavam reduzida massa corpórea (0,6±0,1g), e os tempos de recuperação semelhantes aos obtidos na indução ao estágio de anestesia profunda, cujo tempo de exposição foi menor, também sugerem maior resistência do lambari, na fase de desenvolvimento estudada, por meio de mecanismos não elucidados neste estudo.

CONCLUSÕES

O óleo de cravo possui efeito anestésico para o lambari, na fase de alevino, sendo a concentração 50mg L⁻¹ considerada eficiente e segura para indução à anestesia profunda em até 1,5 minuto e de anestesia cirúrgica em até 3,3 minutos de exposição.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (Protocolo 070308).

REFERÊNCIAS

- DERIGGI, G.F. et al. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v.28, p.269-274, 2006. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/acta/periodicos/index.html>>. Acesso em: 21 ago. 2008. Doi: 10.4025/actascibiolsci. v28i3.401.
- DIAS, R.M. et al. Colonization of the Corumbá Reservoir (Corumbá River, Paraná River Basin, Goiás State, Brazil) by the "lambari" *Astyanax altiparanae* (Tetraodonopterae; Characidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, v.48, p.467-476, 2005.

- GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero da bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, v.1, p.65-88, 2000.
- GILDERHUS, P.A.; MARKING, L.L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v.7, p.288-292, 1987. Disponível em: <<http://afs.allenpress.com>>. Acesso em 18 fev. 2008. Doi: 10.1577/1548-8659(1987)7
- GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1453-1464, 2000. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 20 mar. 2008. Doi: 10.1006/jfbi.2000.1406
- GUÉNÉTTE, S.A. et al. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, p.262-265, 2007. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/aqua-online>. Acesso em 18 fev. 2008. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.046.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperatura effects of anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.1136-1142, 2004. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/idealibrary.com>>. Acesso em: 20 mar. 2008. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2004.00359.x.
- INOUE, L.A.K.A. et al. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.943-947, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500023&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20 mar. 2008. Doi: 10.1590/S0103-84782003000500023.
- INOUE, L.A.K.A. et al. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v.35, p.289-295, 2005.
- IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v.221, p.549-566, 2003. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/aqua-online>. Acesso em 20 mar. 2008. Doi: 10.1016/S0044-8486(03)00111-X.
- IWAMA, G.K.; ACKERMAN, P.A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. **Biochemistry and molecular biology of fishes**. New York: Elsevier, 1994. V.3, p.1-15.
- KEENE, J.L. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.
- KING, W.V. et al. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata L.*). **Aquaculture Research**, v.36, p.1442-1449, 2005. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118667215/PDFSTART>>. Acesso em 11 mar. 2008. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x.
- LEUZZI, M.S.P. et al. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.355-362, 2004.
- MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v.10, p.2-5, 1985.
- PARK, M.O. et al. Anaesthetic effect of lidocaine hydrochloride-sodium bicarbonate and MS-222 on the greenling (*Hexagrammos otakii*). **Journal of the Korean Fisheries Society**, v.36, p.449-453, 2003.
- PARK, M.O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v.39, p.877-884, 2008. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120088613/PDFSTART>>. Acesso em: 13 mar. 2008. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x
- RIBAS, L. et al. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v.269, p.250-258, 2007. Disponível em: www.elsevier.com/locate/aqua-online. Acesso em 18 fev. 2008. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.036.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236p.
- SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulphonate, quinaldine and clove oil anaesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.218, p.177-185, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4D-479KC59-3&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=78342c273663171ddab4d4bbe14cc49>. Acesso em 18 fev. 2008. Doi: 10.1016/S0044-8486(02)00302-2.
- SMALL, B.C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture**, v.238, p.469-481, 2004. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/aqua-online>. Acesso em 18 fev. 2008. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.021.
- SON, M.H. et al. Anaesthetic tolerance of juvenile black rockfish *Sebastes schlegeli*, produced for wild stock enhancement. **Ocean and Polar Research**, v.23, p.285-290, 2001.
- SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1990. p.213-272.
- VINATEA, L. **Princípios químicos de qualidade da água em aquíicultura**. Florianópolis: UFSC, 2004. 345p.
- WALSH, C.T.; PEASE, B.C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, v.33, p.627-635, 2002. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/118931501/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>>. Acesso em: 15 mar. 2008. Doi: 10.1046/j.1365-2109.2002.00701.x.
- WOODY, C.A. et al. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.340-347, 2002. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 20 mar. 2008. Doi: 10.1006/jfbi.2001.1842.
- YANG, B.H. et al. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003. Disponível em: <<http://jdr.sagepub.com>>. Acesso em: 18 fev. 2008. Doi: 10.1177/154405910308201004.