



Óleo de cravo em diferentes concentrações como anestésico para lebiste *Poecilia reticulata*

Clove oil in different concentrations as an anesthetic for guppy *Poecilia reticulata*

Emanuel Soares dos Santos*; Tarcio Gomes da Silva; José Ivan Fonteles de Vasconcelos-Filho; Maria Samara Alves de Freitas; Robério Mires de Freitas & Iana Melo Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE Campus Acaraú

*E-mail: emanuel.aquicultura@gmail.com

Recebido: 7 de maio de 2017 / Aceito: 1 de dezembro de 2017 / Publicado: 22 de dezembro de 2017

Resumo A presente pesquisa procurou identificar a concentração do anestésico óleo de cravo (eugenol) mais adequada a ser utilizada na insensibilização de lebistes (*Poecilia reticulata*) por meio de banhos de imersão e os tempos necessários para atingirem o nível de anestesia profunda e recuperação. Utilizando um cronometro digital foi realizada a cronometragem do tempo necessário para a anestesia e recuperação de 10 peixes em quatro classes de tamanho em cada uma das cinco concentrações do anestésico eugenol (30, 50, 75, 100 e 130 mg L⁻¹) testadas. A concentração 30 mg L⁻¹ não proporcionou o nível de anestesia profunda, não sendo esta recomendada para o uso em biometria para esta espécie. A anestesia nas concentrações de 50 e 75 mg L⁻¹ também se mostraram ineficientes, com tempos médios de indução anestésicas muito elevados. Já a concentração 130 mg L⁻¹ proporcionou tempo de indução abaixo do recomendado pela bibliografia para a segurança de sua aplicação. A concentração 100 mg L⁻¹ de eugenol é a mais indicada para a anestesia por banho de imersão em lebistes para o manejo de biometria em qualquer uma das classes de tamanho testadas, pois o tempo de indução e recuperação anestésica ficou dentro dos limites adotados. O eugenol se mostrou um anestésico seguro para o uso em biometrias para esta espécie, pois não foi observada qualquer mortalidade dos peixes testados.

Palavras-chave: anestesia profunda, biometria, insensibilização, óleo de cravo, peixe ornamental.

Abstract The present study sought to identify the concentration of anesthetic clove oil (eugenol) more suitable to be used in desensitization of guppies (*Poecilia reticulata*) through immersion baths and the time required to reach the level of deep anesthesia and time recovery. Using a digital chronometer was done measurement of the time required for anesthesia and recovery of 10 fish in four size classes for each of the five tested concentrations of the anesthetic eugenol (30, 50, 75, 100 and 130 mg L⁻¹). The concentration of 30 mg L⁻¹ did not provide the level of deep anesthesia, and this is not recommended for use in biometrics. The anesthesia in concentrations of 50 and 75 mg L⁻¹ also are inefficient, with average time of anesthesia induction very high. Since the concentration 130 mg L⁻¹ provided induction time below the recommended bibliography for the security of your application. The concentration 100 mg L⁻¹ of eugenol was the most suitable for anesthesia by immersion bath in guppies for the management of biometrics in any of the tested size classes, since the time of induction and recovery was within the limits adopted. The eugenol proved to be a safe anesthetic for use in biometrics for this species, because it was not observed any mortality the fish tested.

Keywords: deep anesthesia; biometrics; stunning; clove oil, ornamental fish.

Trabalho financiado pela Fundação de Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP (Processo: 0088-00053.01.00/13).

Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo n° 6384121117 - CEUA/IFCE).

Introdução

No Brasil, anestésias vêm sendo utilizadas para diversas espécies de peixes, no intuito de minimizar o estresse e, conseqüentemente, diminuir o sofrimento dos animais, procedimento que tem se mostrado eficiente na redução de problemas relacionados aos manejos cotidianos das pisciculturas (Bittencourt et al., 2013; Bertozzi-Júnior et al., 2014).

A ação de um anestésico pode ser definida como um estado de perda da sensação causado por um agente externo, por meio da depressão do sistema nervoso, sendo que a eficácia dos anestésicos varia entre as espécies, para cada uma há o tempo ótimo tanto para a indução quanto para a recuperação anestésica, assim, é importante conhecer a concentração e o tempo de exposição ao anestésico, para que não ocasione problemas aos animais (Bittencourt et al., 2013).

Santos et al. (2016) relatam que os anestésicos mais utilizados para os manejos nas pisciculturas são a tricafna metanosulfonato (MS 222), 2-fenoxietanol e a quinaldina, no entanto estas substâncias apresentam custo significativo, o que dificulta o uso pelos pequenos produtores, desta forma justifica-se a busca por anestésicos naturais como alternativa de baixo custo.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos no Brasil visando testar o tempo e efeito dos anestésicos naturais em espécies de peixes nativas (Gonçalves et al., 2012; Benovit et al., 2012; Silva et al., 2015; Santos et al., 2016; Barbas, Stringhetta, Garcia & Figueiredo, 2016; Hohlenwerger et al., 2017).

Dentre estes anestésicos naturais, possivelmente o que vem sendo mais testado seja o óleo essencial de cravo, um composto fenólico resultado da destilação das folhas e flores das árvores de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), tendo o eugenol, ou 4-alil-2-metoxifenol, como a substância ativa (Affonso, Rennó, Slana & França, 2012; Balamurugan et al., 2016).

Ao realizar o levantamento bibliográfico acerca dos experimentos que utilizaram o eugenol como anestésico em espécies de peixes nativas do Brasil, destacaram-se as pesquisas realizadas por Barbosa, Moraes & Inoue (2007); Vidal et al. (2007); Okamoto, Tesser, Louzada, Santos & Sampaio (2009); Honczaryk & Inoue (2009); Rotili et al. (2012); Pádua et al. (2013); Bernardes-Júnior, Nakagome, Mello, Garcia & Amaral-Júnior, (2013); Ribeiro et al. (2013); Bertozzi-Júnior et al. (2014); no entanto estes experimentos focaram as espécies utilizadas para alimentação.

Impulsionadas pela importância econômica do mercado mundial de peixes ornamentais, onde a participação do Brasil representa 6,3% deste mercado e movimenta aproximadamente US\$ 100,4 bilhões anualmente (Farias, Ribeiro, Almeida, Santos & Santos, 2016), as pesquisas com o uso de anestésicos em espécies ornamentais são comuns e de grande importância devido as características intrínsecas da atividade, em que os animais passam por várias manipulações e percorrem grandes distâncias entre os locais de produção e comercialização e muitas destas espécies tem como foco os mercados internacionais.

Como exemplo deste esforço de pesquisa com espécies ornamentais é possível citar o estudo realizado por Pawar et al. (2011) que testaram diferentes anestésicos, dentre eles o eugenol, para o cavalo-marinho amarelo (*Hippocampus kuda*), o de Mitjana et al. (2014) para o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), Bolasina, Azevedo & Petry (2017) para o lebiste (*Poecilia vivipara*) e Santos, Silva & Freitas (2016) testaram diferentes concentrações de óleo de cravo em biometrias de molinésia (*Mollienesia* sp.); sendo válido salientar que os lebistes e molinésias são da mesma família que os lebistes (*Poecilia reticulata*), a espécie utilizada neste estudo.

A presente pesquisa objetivou identificar a concentração do anestésico eugenol mais adequada a ser utilizada na insensibilização de lebistes (*Poecilia reticulata*) de diferentes tamanhos por meio de banhos de imersão e os tempos necessários para atingirem o nível de anestesia profunda e recuperação.

Material e Métodos

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Aquicultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE Campus Acaraú (LAICA) (2°53'22,25"S, 40°06'48,86"O), o qual está localizado na cidade de Acaraú-CE, Brasil.

Foram testadas cinco concentrações do anestésico: 30 mg L⁻¹, acrescentando 0,3 ml da solução estoque em 1,0 litro de água; 50 mg L⁻¹, acrescentando 0,5 ml da solução estoque em um 1,0 litro de água; 75 mg L⁻¹, acrescentando 0,75 ml da solução estoque em 1,0 litro de água; 40 mg L⁻¹, acrescentando 1,0 ml da solução estoque em 1,0 litro de água; e 150 mg L⁻¹, acrescentando 1,5 ml da solução estoque em 1,0 litro de água. A anestesia foi realizada por meio de banhos de imersão, onde cada indivíduo era anestesiado individualmente.

Para a preparação da solução-estoque do anestésico com óleo de cravo, tendo como princípio ativo o eugenol, foi seguido o procedimento descrito por Vidal et al. (2008), onde utilizou-se 5,0 ml do óleo essencial de cravo, na concentração de $1,0 \text{ g mL}^{-1}$, que em razão de sua natureza oleosa, foi diluído em 50 ml de álcool etílico ($92,8^\circ$), resultando em uma solução-estoque à concentração de 100 mg mL^{-1} (1:10).

Foram utilizados exemplares de lebetes (*Poecilia reticulata*) de diferentes tamanhos e idades oriundos do estoque mantido no LAICA, os quais haviam sido separados manualmente por seleção visual em quatro classes de tamanho, denominadas: P – pequenos; M – médios; G – grandes; e GG – muito grandes; somente durante a biometria realizada neste experimento foram caracterizados os animais de cada classe de tamanho, sendo os resultados posteriormente expostos.

Após essa separação visual os peixes foram estocados em quatro aquários contendo 80 litros de água, aeração constante e fornecimento de alimento por duas semanas antes da realização do experimento, onde a cada dois dias foram realizadas trocas parciais de 20% do volume de água dos aquários, garantindo assim a manutenção da qualidade da água. Desta forma pode ser mantida a condição de bem-estar dos animais e garantir que alguma mortalidade que viesse a acontecer seria por causa das condições experimentais e não do manejo de seleção anteriormente realizado.

Os peixes foram capturados individualmente e, utilizando um cronometro digital, foi realizada a cronometragem do tempo necessário para a indução e recuperação anestésica. Foram anestesiados 10 exemplares de cada classe de tamanho, em cada uma das cinco concentrações do anestésico eugenol (30, 50, 75, 100 e 150 mg L^{-1}) testadas, totalizando um “n” amostral de 200 peixes (10 peixes x 04 classes de tamanho x 05 concentrações de anestésico). O tempo para realização da biometria, isto é, o tempo em que os peixes ficaram anestesiados, foi fixado em 120 segundos para todos os espécimes anestesiados.

Para o processo de anestesia foi utilizado um aquário de vidro com 1,0 litro de água e anestésico conforme a concentração testada, no qual os peixes eram colocados individualmente até que atingissem o estágio IV, anestesia profunda, segundo escala proposta por Ross & Ross (2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos estágios de anestesia em peixes.

Estágio	Descrição	Resposta comportamental em peixes
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	Narcose	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.
V	Anestesia cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo; movimentos operculares lentos e irregulares; batimentos cardíacos lentos; perda total de todos os reflexos.
VI	Colapso medular	Parada da ventilação; parada cardíaca; morte eventual.

Adaptado de Ross & Ross (2008); Vidal et al. (2008).

Para a recuperação foi usado um aquário com as mesmas características do utilizado para anestesia, porém com aeração constante por meio de um soprador e pedra porosa. Após a recuperação total os peixes foram transferidos separadamente conforme a concentração de anestésico e tamanho utilizado para aquários de vidro com 40 litros e aeração constante para observação por 96 horas. A concentração de oxigênio dissolvido nos aquários se manteve em $4,5 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ e a temperatura $27,3 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o período de experimento e observação.

Para a obtenção do modelo matemático capaz de prever o efeito do anestésico nos lebetes, utilizando o software Microsoft Excel®, foram plotados em um gráfico os resultados obtidos em cada uma das concentrações testadas (C) no eixo “x” (abscissa); e do tempo de indução anestésica (T_i) no eixo “y” (ordenada); a partir do qual foi gerado o modelo matemático mais adequado para a representação dos resultados, obtendo-se assim a equação adequada para a espécie em estudo.

Na biometria foi realizada a medição do comprimento padrão (mm), utilizando paquímetro digital (150mm), e peso médio (g), utilizando balança digital. Os dados de tempo de indução, recuperação e da

biometria foram submetidos a Análise de Variância (Anova) um critério ao nível de significância de 5,0% ($\rho = 0,05$) e ao teste de Tukey para a comparação entre as médias, utilizando o software Bioestat 5.0.

Resultados e Discussão

Na Tabela 2 estão expostos os resultados de peso e comprimento padrão obtidos na biometria realizada utilizando as diferentes concentrações de anestésico nas quatro classes de tamanho, os quais mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre estas, apontando que a separação manual por seleção visual realizada foi eficaz para classificação dos peixes.

Tabela 2. Resultados de peso médio (Pm) e comprimento padrão (CP) obtidos nas biometrias realizadas nos quatro tamanhos de lebetes nas cinco concentrações testadas.

Indicadores Zootécnicos	Classes de Tamanho			
	GG	G	M	P
P _m (g)	0,632 ± 0,366 ^a	0,363 ± 0,130 ^b	0,208 ± 0,082 ^c	0,062 ± 0,041 ^d
CP (mm)	27,85 ± 4,29 ^a	24,08 ± 2,75 ^b	20,27 ± 2,60 ^c	14,35 ± 1,58 ^d

Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Para avaliação dos resultados de tempo de indução anestésica e de recuperação é necessário tomar como base os valores sugeridos pela bibliografia especializada. Segundo Roubach et al. (2005), quando se considera a anestesia necessária para a realização de biometria, a indução da anestesia deve levar de 60 a 180 segundos e a recuperação não deve ultrapassar 300 segundos.

Desta forma, observa-se que o tratamento que utilizou a concentração de anestésico 30 mg L⁻¹ foi ineficiente para as quatro classes de tamanho testadas, pois em todas o tempo foi muito além do indicado para a indução anestésica, inclusive é válido salientar que ultrapassou 600 segundos e os peixes não alcançaram o estágio IV de anestesia (anestesia profunda), então optou-se por suspender a indução anestésica neste tempo e adotá-lo como limite.

Em contraponto a este resultado estão os obtidos por Santos, Silva & Freitas (2016), os quais realizando pesquisa semelhante a esta obtiveram que a melhor concentração a ser utilizada para a anestesia de molinésias com eugenol é de 30 mg L⁻¹.

A anestesia nas concentrações de 50 mg L⁻¹ e 75 mg L⁻¹ também se mostraram ineficientes para as quatro classes de tamanho testadas, pois os tempos médios de indução anestésicas foram muito elevados, estando acima da faixa usada como referência. Cunha et al. (2015) encontraram que a concentração de 75 mg de eugenol por litro foi a mais indicada para a anestesia de fêmeas de lebeste.

A concentração de 130 mg L⁻¹ proporcionou tempo médio de indução de 53,56 ± 6,68 s que foi abaixo do recomendado pela bibliografia. E próximo a esta concentração está a recomendada por Cunha et al. (2015), o qual apontou 125 mg L⁻¹ como a melhor concentração de eugenol para a anestesia de lebetes machos.

Na presente pesquisa, a anestesia com o uso de eugenol na concentração de 100 mg L⁻¹ obteve os melhores resultados em relação ao tempo de indução, pois nas quatro classes de tamanho testadas ficou dentro do intervalo de 60 a 180 segundos tomados como referência. Note que Hoshiba et al. (2015) apontaram as concentrações de eugenol entre 100 e 200 mg L⁻¹ como as mais recomendadas para a anestesia de platis (*Xiphophorus maculatus*), espécie da mesma família dos lebetes.

Contrariando um pouco os resultados anteriormente citados, Bolasina, Azevedo & Petry (2017) relatam que os três anestésicos que testaram (benzocaína, tricaína e eugenol) foram sedativos eficazes para procedimentos de rotina de lebetes, os mesmos relataram que a dose ótima de benzocaína e tricaína foi 200 mg L⁻¹ para anestesia profunda. Entretanto, para o uso do eugenol, não encontraram diferenças significativas usando concentrações de 150, 200 e 250 mg L⁻¹. Estes autores concluíram que em larga escala a benzocaína e tricaína são mais indicadas que o eugenol.

Na Tabela 3 podem ser observados os tempos de indução médios e os respectivos desvios padrão obtidos nas cinco concentrações de eugenol testadas para as quatro classes de tamanho de lebetes.

Em relação aos tempos de recuperação observou-se que em nenhum dos testes foi ultrapassado o tempo de 300 segundos para recuperação anestésica recomendado pela bibliografia, no entanto é válido salientar que os menores tempos observados foram no tratamento que utilizou a concentração de anestésico de 30 mg

L⁻¹, que pode ser explicado pelo fato dos peixes não terem alcançado o estágio de anestesia profunda no tempo de 600 segundos, posto como limite do experimento.

Tabela 3. Resultados médios e desvios padrão de tempo de indução anestésica (s) obtidos nas cinco concentrações de eugenol testadas para as quatro classes de tamanho de lebetes (*Poecilia reticulata*).

Classes de Tamanho	Tempo de Indução Anestésica (s)				
	130 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	30 mg L ⁻¹
GG	124,63 ± 13,17c	108,04 ± 51,03c	318,50 ± 58,43bc	253,30 ± 31,72bc	>600a
G	134,59 ± 20,59c	155,16 ± 25,47c	168,81 ± 41,93c	424,57 ± 69,57b	>600a
M	82,65 ± 17,44c	106,27 ± 32,20c	220,01 ± 33,73b	199,28 ± 58,18b	>600a
P	53,56 ± 6,68c	111,93 ± 26,73b	134,30 ± 29,99b	575,54 ± 47,52a	>600a

Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

É válido salientar que durante a biometria com esta concentração os peixes ficaram entre o estágio de sedação leve e profunda (estágios I e II), dentre os quais alguns se movimentavam frequentemente, o que poderia ter causado injúrias durante a biometria. Sendo assim, reforça-se a afirmativa de que a concentração de anestésico de 30 mg L⁻¹ é ineficiente para o uso na biometria de lebetes. Sugere-se que esta concentração pode ser utilizada para a sedação em manejo de transporte, sendo necessários mais estudos para comprovar esta hipótese.

Na Tabela 4 podem ser observados os tempos de recuperação médios e os respectivos desvios padrão obtidos nas cinco concentrações de eugenol testadas para as quatro classes de tamanho de lebetes.

Tabela 4. Resultados médios e desvios padrão de tempo de recuperação (s) obtidos nas cinco concentrações de eugenol testadas para as quatro classes de tamanho de lebetes (*Poecilia reticulata*).

Classes de Tamanho	Tempo de Recuperação (s)				
	130 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	30 mg L ⁻¹
GG	99,55 ± 23,34bc	64,02 ± 23,34c	192,98 ± 60,07a	128,21 ± 55,87b	95,65 ± 28,79bc
G	149,63 ± 76,88a	120,20 ± 47,34a	119,93 ± 53,84a	170,82 ± 55,78a	21,97 ± 22,79b
M	59,98 ± 7,82a	59,91 ± 13,93ab	64,77 ± 11,53a	64,76 ± 25,34a	41,55 ± 16,83b
P	134,38 ± 38,90ab	186,75 ± 103,54a	118,11 ± 48,47ab	176,23 ± 44,13a	54,46 ± 10,20b

Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p<0,05).

Devido a ineficácia da concentração 30 mg L⁻¹ em proporcionar o estágio de anestesia desejado para o experimento, os dados obtidos nesta não foram utilizados para a obtenção do modelo matemático para previsão do efeito do anestésico, a curva que melhor representou os dados obtidos seguiu um modelo polinomial de ordem 3, assim, o modelo matemático encontrado para prever o efeito do anestésico nos animais é representado pela equação $T_i = -0,0026C^3 + 0,7769C^2 - 76,073C + 2548,3$ ($R^2 = 0,6215$), onde "Ti" é o tempo necessário para a indução e "C" a concentração de eugenol utilizada. A Figura 1 apresenta a curva de concentração-efeito para o uso do eugenol na anestesia de lebetes.

Não foi observada qualquer mortalidade em nenhuma das concentrações ou tamanhos de peixes testados durante o período de observação (96 horas), o que aponta o eugenol como um anestésico seguro para o uso em lebetes.

Corroborando com essa afirmativa, Bolasina, Azevedo & Petry (2017) monitoraram a sobrevivência por um período de 15 dias e não registraram qualquer mortalidade dos lebetes que haviam sido usados nos testes com anestésicos. Hoshiba et al. (2015) e Cunha et al. (2015) observaram os platis e lebetes, respectivamente, por 96 horas após o fim dos experimentos com uso do eugenol e também não observaram qualquer mortalidade.

Já, Santos, Silva & Freitas (2016) observaram em molinésias mortalidade de apenas 10% nas concentrações 10, 20 e 50 mg L⁻¹, as quais ocorreram apenas nas primeiras 24 horas das 96 observadas.

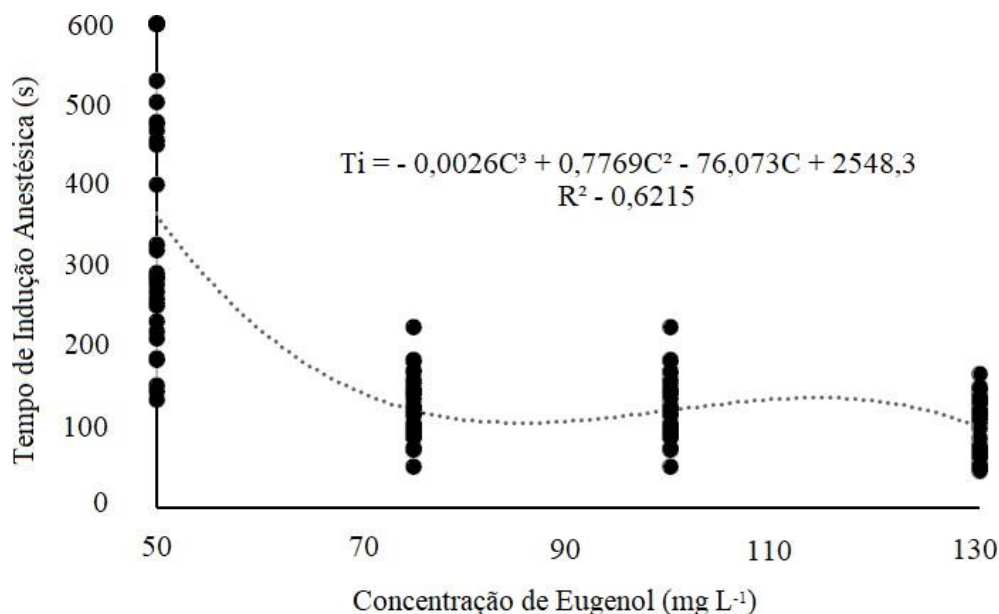


Figura 1. Curva dos tempos de indução anestésica (s) de leibistes (*Poecilia reticulata*) em diferentes tamanhos utilizando eugenol nas concentrações 50, 75, 100 e 130 mg L⁻¹.

Conclusões

A concentração 100 mg L⁻¹ de eugenol foi a mais indicada para a anestesia por banho de imersão em leibistes (*Poecilia reticulata*) para o manejo de biometria em qualquer uma das classes de tamanho testadas.

A concentração 30 mg L⁻¹ de eugenol não é indicada na anestesia de leibistes para biometria, pois os peixes não atingem o estágio de anestesia profunda. Sugere-se esta concentração na sedação para o transporte, sendo necessários mais estudos a este respeito.

O eugenol se mostrou um anestésico seguro para o uso em biometrias em leibistes, pois não foi observada qualquer mortalidade durante o experimento e no período de observação de 96 horas.

Referências

- Affonso, R.S.; Rennó, M.N.; Slana, G.B.C.A. & França, T.C.C. (2012). Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Rev. Virtual Quim.* 4(2): 146-161.
- Balamurugan, J.; Ajith Kumar, T. T.; Prakash, S.; Meenakumari, B.; Balasundaram, C. & Harikrishnan, R. (2016). Clove extract: A potential source for stress free transport of fish. *Aquaculture.* 454: 171-175. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.020.
- Barbas, L.A.L.; Stringhetta, G.R.; Garcia, L.O.; Figueiredo, M.R.C. & Sampaio, L.A. (2016). Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. *Aquaculture.* 456: 70-75. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.01.026.
- Barbosa, L.G.; Moraes, G. & Inoue, L.A.K.A. (2007). Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. *Acta Sci. Biol. Sci.* 29(3): 255-260.
- Benovit, S.C.; Gressler, L.T.; Silva, L.L.; Garcia, L.O.; Okamoto, M.H.; Pedron, J.S.; Sampaio, L.A. & Rodrigues, R.V. (2012). Anesthesia and transport of brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *J. World Aquac. Soc.* 43: 896-900.
- Bernardes-Júnior, J.J.; Nakagome, F.K.; Mello, G.L.; Garcia, S. & Amaral-Júnior, H. (2013) Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. *Pesq. Agropec. Bras.* 48(8): 1140-1144. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800049.
- Bertozi-Júnior, M.; Diemer, O.; Neu, D.H.; Bittencourt, F.; Boscolo, W.R. & Feiden, A. (2014). Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis de *Pimelodus britskii* (mandi-pintado). *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 9(1): 134-138.

- Bittencourt, F.; De Souza, B.E.; Neu, D.H.; Rorato, R.R.; Boscolo, W.R. & Feiden, A. (2013). Eugenol e benzocaína como anestésicos para juvenis de *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (carpa comum). *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 8(1): 163-167.
- Bolasina, S.N.; Azevedo, A. & Petry, A.C. (2017). Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. *Aquac. Reports.* 6: 56–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.002>.
- Cunha, L.; Geraldo, A.M.R.; Silva, V.C.; Cardoso, M.S.; Tamajusuku, A.S.K.; Hoshiba, M.A. (2015). Clove oil as anesthetic for guppy. *Bol. Inst. Pesca.* 41(esp.): 729-735.
- Farias, P.M.C.; Ribeiro, K.; Almeida, C.F.; Santos, F.W.M.; Santos, R.F.B. (2016). Aquicultura Ornamental: um mercado promissor. *Panoram. Aquic.* 26 (154): 24-37.
- Gonçalves, A.F.N.; Santos, E.C.C.¹; Fernandes, J.B.K.; Takahashi, L.S. (2008). Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Sci. Anim. Sci.* 30(3): 339-344. DOI: 10.4025/actascianimsci.v30i3.1081.
- Hohlenwerger, J.C.; Baldisserotto, B.; Couto, R.D.; Heinzmann, B.M.; Da Silva, D.T.; Caron, B.O.; Schmidt, D.; Copatti, C.E. (2017). Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. *Cienc. Rural.* 47(3) e20160040. DOI: 10.1590/0103-8478cr20160040.
- Honzaryk, A. & Inoue, L.A.K.A. (2009). Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills. *Cienc. Rural.* 39(2): 577-579.
- Hoshiba, M.A.; Dias, R.M.S.; Moreira, K.M.F.; Cunha, L.; Geraldo, A.M.R. & Tamajusuku, A.S.K. (2015). Clove oil and menthol as anesthetic for platy. *Bol. Inst. Pesca.* 41(esp.): 737 - 742.
- Mitjana, O.; Bonastre, C.; Insua, D.; Falceto, M.V.; Esteban, J.; Josa, A.; Espinosa, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture.* 433: 491–495.
- Pawar, H.B.; Sanaye, S.V.; Sreepada, R.A.; Harish, V.; Suryavanshi, U.; Tanu & Ansari, Z.A. (2011). Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture.* 311: 155-161.
- Pádua, S.B.; Dias Neto, J.; Sakabe, R.; Claudiano, G.S.; Chagas, E.C. & Pilarski, F. (2013). Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. *Pesq. Agropec. Bras.* 48(8): 1171-1174. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800056.
- Okamoto, M.H.; Tesser, M.B.; Louzada, L.R.; Santos, R.A. & Sampaio, L.A. (2009). Benzocaine and eugenol as anaesthetics for pompano juvenile *Trachinotus marginatus*. *Cienc. Rural.* 39(3): 866-870.
- 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. *Pesq. Agropec. Bras.* 48(8): 1136-1139. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800048.
- Ross, L.G. & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed. Oxford:Blackwell Science, p. 240.
- Rotili, D.A.; Devens, M.A.; Diemer, O.; Lorenz, E.K.; Lazzari, R. & Boscolo, W.R. (2012). Uso de eugenol como anestésico em pacu. *Pesq. Agropec. Trop.* 42(3): 288-294.
- Roubach, R.; Gomes, L.G.; Fonseca, F.A.L. & Val, A.L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac. Res.* 36: 1056-1061. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x.
- Santos, V.A.; Santos, P.R.B.; Malcher, C.S.; Lourenço, C.B.; Trindade, G.V. & Souza, R.A.L. (2016). Anesthetic induction of the aqueous extract of cunambi, "*Clibadium surinamense*" linn to perform biometrics in tambaquis, "*Colossoma macropomum*". *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 17(2): 291-298.
- Santos, E.S.; Silva, T.G. & Freitas, R.M. (2016). Diferentes concentrações de eugenol na anestesia de molinésia *Mollienesia* sp. *Rev. Bras. Eng. Pesca.* 9(2): 10-18.
- Silva, L.L.; Garlet, Q.I.; Koakoski, G.; De Abreu, M.S.; Mallmann, C.A.; Baldisserotto, B.; Barcellos, L.J.G. & Heinzmann, B.M. (2015). Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. *Neotrop. Ichthyol.* 13(4): 715-722. DOI: 10.1590/1982-0224-20150012.