

Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo

Luiz Vítor Oliveira Vidal⁽¹⁾, Ricardo Castelo Branco Albinati⁽²⁾, Ana Catarina Luscher Albinati⁽³⁾,
Alessandra Danile de Lira⁽²⁾, Tainá Rocha de Almeida⁽²⁾ e Gisele Baiana Santos⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Avenida Colombo, nº 5.790, CEP 87020-900 Maringá, PR. E-mail: luizvitor.vidal@gmail.com ⁽²⁾Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Laboratório de Aqüicultura e Sanidade de Organismos Aquáticos, Avenida Adhemar da Barros, nº 500, CEP 40170-110 Salvador, BA. E-mail: albinati@ufba.br, sandrinha_lira@yahoo.com.br, veterinaria200601@yahoo.com.br, veterinariaufba@yahoo.com.br ⁽³⁾Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Medicina Veterinária, Rodovia BR 407, Quadra 12, Lote 543, Projeto Irrigação Nilo Coelho, CEP 56300-000 Petrolina, PE. E-mail: anacatarina.albinati@univasf.edu.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. Para a concentração ideal, foram avaliados seis tratamentos (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹), com dez peixes por tratamento, anestesiados individualmente, acompanhados durante a indução e recuperação. A toxicidade foi estimada pela submissão de 210 peixes a 7 concentrações de eugenol (50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 mg L⁻¹), durante 600 s e, para a margem de segurança, 120 peixes foram submetidos a 75 mg L⁻¹ durante cinco intervalos de tempo (600, 1.200, 1.800 e 2.400 s). As concentrações eficientes foram 50 e 75 mg L⁻¹. Os valores de toxicidade letal (CL), aos 600 s, foram: CL01, 81,97 mg L⁻¹; CL50, 184,26 mg L⁻¹; e CL99, 286,55 mg L⁻¹; e os tempos de concentrações letais (TCL) foram: TCL01, 566,97 s; TCL50, 1.611,66 s; e TCL99, 2.656,34 s. Concluiu-se que 75 mg L⁻¹ são suficientes para a anestesia profunda de curta duração, com margem de segurança de 484,27 s, e 50 mg L⁻¹ para longos períodos (600 s). A maior concentração terapêutica do eugenol custa R\$ 0,065 por litro de água. A eutanásia pode ser realizada com 286,55 mg L⁻¹ durante 600 s.

Termos para indexação: *Oreochromis niloticus*, anestesia, custo, segurança.

Eugenol as an anesthetic for Nile tilapia

Abstract – The objective of this work was to evaluate eugenol as anesthetic for Nile tilapia. For the best concentration of the anaesthetic, six treatments (50, 75, 100, 150, 200, and 250 mg L⁻¹) were evaluated, with ten fishes per treatment, anaesthetised individually and monitored during the induction and recovery. Toxicity was estimated in 210 fish submitted to seven eugenol concentrations (50, 75, 100, 150, 200, 250, and 300 mg L⁻¹) for 600 s; and for safety margin, 120 fish were submitted to 75 mg L⁻¹ for five time intervals (600, 1,200, 1,800, and 2,400 s). The effective concentrations were 50 and 75 mg L⁻¹. Lethal concentration (LC) values for 600 s were: LC01 81.97 mg L⁻¹, LC50 184.26 mg L⁻¹, and LC99 286.55 mg L⁻¹. Times of lethal concentration (TLC) were TLC01 566.97 s, TLC50 1,611.66 s, and TLC99 2,656.34 s. For fast deep anesthesia, 75 mg L⁻¹ of eugenol is recommended, with a safety margin of 484,27 s; for long period anesthesia (600 s) 50 mg L⁻¹ were recommended. The higher therapeutic concentration costs R\$ 0.065 per liter. Eugenol was effective for euthanasia at 286.55 mg L⁻¹ for 600 s.

Index terms: *Oreochromis niloticus*, anesthesia, cost, safety.

Introdução

Nos sistemas intensivos de piscicultura, os animais passam por diversas situações estressantes. Além das altas densidades utilizadas durante a criação, alguns procedimentos rotineiros são fontes de estresse para os peixes, entre eles: biometria, transporte, reprodução induzida e coleta de ovos. Como conseqüências, podem ocorrer desde perda do apetite e peso, redução no crescimento, aparecimento de doenças ou a morte dos animais (Barcellos et al., 2000).

A utilização de anestésicos, durante o manejo, pode aliviar a maioria das reações de estresse (Ross & Ross, 2008), além de reduzir a motilidade e facilitar o manejo dos peixes (Inoue et al., 2005). O óleo de cravo é uma substância fenólica obtida da destilação das folhas, caule e flores do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que apresenta na composição de 70 a 95% do seu princípio ativo, o eugenol (Mazzafera, 2003). Os estudos sobre a utilização do eugenol como anestésico, em aqüicultura, surgiram da necessidade de se encontrarem novas substâncias eficazes, seguras e

de baixo custo (Roubach et al., 2005). Sua utilização em peixes acontece na forma de banho de imersão, porém em razão da natureza hidrofóbica da substância, deve-se fazer uma solução-estoque em álcool e, após isso, o anestésico pode ser diluído em água.

O anestésico ideal deve: permitir duração razoável de exposição; produzir anestesia em três minutos ou menos e recuperação em menos que cinco; não apresentar toxicidade aos peixes, durante o tratamento; não apresentar problema de segurança para mamíferos; deixar pouco resíduo, após período de depuração de uma hora ou menos; e ter custo acessível (Marking & Meyer, 1985). Entre as características desejáveis, o eugenol apresenta boa velocidade de ação, pois induz rapidamente à anestesia profunda (Woody et al., 2002; Hajek et al., 2006); e diminui os efeitos do estresse causado pelo manejo (Inoue et al., 2005). Kildea et al. (2004) verificaram que a carne de percas prateadas (*Bidyanus bidyanus*), anestesiadas ou sacrificadas com esse anestésico, apresentou valores residuais inferiores aos autorizados para o consumo humano, o que tornou desnecessário o período de depuração.

O mecanismo exato de ação do eugenol ainda está sob investigação. Porém, estudos *in vitro* indicam interação com neurotransmissores envolvidos na sensação de dor, com efeito agonista sobre o ácido gama-aminobutírico (GABA) e antagonista sobre o glutamato, que atua sobre os receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), ambos com grande importância na transmissão da dor (Aoshima & Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, causa anestesia e redução dos movimentos respiratórios e dos batimentos cardíacos (Iggo & Klemm, 1996).

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) é atualmente a espécie mais criada na piscicultura brasileira e está entre as mais importantes da atividade no mundo (FAO, 2007). A espécie apresenta espinhos ósseos nas nadadeiras, que frequentemente provocam machucados nos técnicos. Assim, o uso de anestésicos durante o manejo é necessário para a tilápia, não somente para a redução do estresse, como para o aumento da segurança no trabalho dos técnicos da área.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o eugenol como anestésico para a tilápia-do-nylo.

Material e Métodos

Foram realizados três experimentos no Laboratório de Aqüicultura e Sanidade de Organismos Aquáticos, da

Escola de Medicina Veterinária, da Universidade Federal da Bahia, em janeiro de 2008. Em todos os experimentos, foram utilizados 430 juvenis de tilápia-do-nylo, com peso médio de 5,34 g. Para adaptação, os peixes foram mantidos em uma caixa de 1.000 L durante cinco dias, com aeração constante, alimentados com ração extrusada (Purina Nutripeixe SI Crescimento) com 28% de proteína bruta, desintegrada em moedor de carne, com os grânulos selecionados retidos em malha de um milímetro. Os peixes foram alimentados à vontade uma vez ao dia, às 8h. Diariamente, foi realizada a sifonagem, para retirada de fezes e ração não consumida, e foram renovados 10% da água do tanque. A temperatura durante a aclimatação variou de 25 a 27°C.

Em todos os experimentos, foram utilizados aquários de vidro com volume útil de 40 L, com 5 L de água. A temperatura da água foi mantida a 25±1°C, o oxigênio dissolvido foi mantido entre 5,5±0,5 mg L⁻¹, e o pH foi 7,5. Em cada aquário, o sistema de aeração foi constante, mantido por meio de pedra porosa acoplada a um soprador. A temperatura da água, o oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados por meio de kit digital portátil (Alfakit – AT300). Em cada experimento, foi utilizado um grupo-controle, em água sem anestésico, para monitoramento dos parâmetros comportamentais e possível mortalidade durante os procedimentos.

O eugenol (Biodinâmica), em razão de sua natureza oleosa, foi diluído em álcool etílico (92,8°), e resultou em solução-estoque à concentração de 100 mg mL⁻¹ (1:10).

Para se determinar a influência da concentração, na indução e na recuperação anestésica dos animais, foram testados seis tratamentos (50, 75, 100, 150, 200, 250 mg L⁻¹ de eugenol). Para cada tratamento, foram utilizados dez juvenis (n = 10), coletados aleatoriamente e submetidos, um a cada vez, ao banho anestésico, no total de 60 peixes. Quando atingiram o estágio anestésico IV (anestesia profunda) (Tabela 1), os peixes foram retirados do aquário de indução e transferidos ao aquário de recuperação. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: ausência de reação a estímulos externos, verificada pelo toque na lateral dos peixes com um bastão de vidro; perda total do tônus muscular quando os animais eram retirados da água e colocados em posição lateral (a cauda deveria permanecer totalmente pendida para baixo).

A recuperação anestésica foi realizada individualmente, em aquário com água sem eugenol e, para sua

constatação, foi adotado o estágio de recuperação anestésica II, cujas respostas comportamentais são o retorno parcial do equilíbrio e a capacidade de nado (Tabela 2). Os tempos necessários para o aparecimento dos padrões comportamentais avaliados, foram monitorados por meio de cronômetro digital.

Para a determinação da concentração letal (CL), foram testadas sete diluições do anestésico (50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 mg L⁻¹), com três repetições. Para cada repetição foram utilizados dez peixes (n = 10), no total de 210 peixes expostos às soluções anestésicas durante 600 s (Velíšek et al., 2005b).

Para o tempo de concentração letal (TCL), foi utilizada a concentração de 75 mg L⁻¹, concentração ideal determinada no primeiro experimento do trabalho, e os seguintes tempos de exposição à concentração de eugenol foram avaliados: 600, 1.200, 1.800, e 2.400 s. Cada tratamento teve três repetições e 10 peixes por unidade experimental, no total de 120 peixes.

Nos ensaios realizados para a determinação da CL e do TCL, após a exposição ao eugenol, os peixes foram transferidos para aquários com água sem eugenol e observados durante 30 min. Foi registrada a morte daqueles que não apresentaram sinal de recuperação (retorno dos movimentos operculares) dentro desse período (Vidal et al., 2007a).

O custo da concentração efetiva por litro de água levou em consideração o valor comercial do anestésico no Brasil, proveniente de catálogo eletrônico (Sigma-Aldrich, 2008).

Para a análise estatística, os dados do efeito da concentração do eugenol sobre os peixes foram submetidos à ANOVA, critério único. As médias de cada concentração de anestésico foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. A estimativa

de resposta dos animais ao anestésico foi obtida por meio de regressão não linear. As concentrações letais do eugenol e os tempos de concentrações letais foram estimados por meio de análise PROBIT. Todas as análises foram realizadas com o SPSS 13.0 (SPSS Incorporation, 2004).

Resultados e Discussão

Em todas as concentrações, os animais atingiram o estágio de anestesia profunda. Durante a indução anestésica, o comportamento dos peixes seguiu o seguinte padrão: hiperatividade ao primeiro contato com o anestésico, caracterizada pela natação agitada contra as paredes do aquário; natação lenta; parada do animal na posição dorso ventral, em alguns casos, com leve inclinação para um dos lados; perda da reação aos estímulos externos; perda do tônus muscular. Nas maiores concentrações (200 e 250 mg L⁻¹), a passagem gradativa por essas respostas comportamentais não foi evidente, pela velocidade de ação do eugenol.

O padrão comportamental da hiperatividade inicial dos peixes foi descrito por Grush et al. (2004). Mylonas et al. (2005) atribuíram essa reação ao próprio eugenol, uma vez que exemplares de dourada (*Sparus aurata*) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) não apresentaram reações adversas à quantidade de álcool utilizado na diluição do anestésico. Assim como exemplares de paulistinha (*Danio rerio*), expostos a 1.400 ppm de álcool durante 96 horas, não apresentaram mudança no padrão comportamental (Grush et al., 2004). De acordo com Collins (1978), a euforia é o primeiro comportamento observado em um animal submetido à anestesia geral.

Tabela 1. Estágios de anestesia em peixes⁽¹⁾.

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	Narcore	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.

⁽¹⁾Modificado de Ross & Ross (2008).

As primeiras concentrações testadas (50, 75 e 100 mg L⁻¹) apresentaram redução significativa no tempo de indução anestésica; a recuperação só apresentou diferença significativa a partir dos 200 mg L⁻¹ (Tabela 3). O padrão de influência do eugenol na indução e recuperação foi semelhante aos obtidos com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Keene et al., 1998), bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (Waterstrat, 1999), salmão-vermelho (*Oncorhynchus nerka*) (Woody, 2002) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Roubach et al., 2005).

O coeficiente de variação (CV) da indução anestésica foi menor (26,96%) do que o da recuperação (34,17%). Esses CV de indução e recuperação foram semelhantes aos observados em: matrinxã (*Brycon cephalus*), 13,86 e 24,84% (Inoue et al., 2003); tambaqui (*Colossoma macropomum*), 24,54 e 44,67% (Roubach et al., 2005); *B. cephalus*, 13,93 e 30,81% (Vidal et al., 2007b); e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), 16,91 e 22,01% (Vidal et al., 2007a). De modo geral, as respostas dos animais apresentaram CV de 20 a 30%, e algumas muito instáveis apresentaram coeficientes superiores a 30% (Sampaio, 2007).

A curva de regressão obtida em relação à indução anestésica (Figura 1) seguiu o mesmo modelo matemático encontrado por Inoue et al. (2003), para *B. cephalus*, e por Vidal et al. (2007a, 2007b), para *B. cephalus* e *L. macrocephalus*, respectivamente. Esses autores observaram queda elevada no tempo de indução, nas primeiras concentrações, com tendência à estabilidade nas últimas, assim como observado neste trabalho.

De acordo com Marking & Meyer (1985), a indução à anestesia profunda deve levar de 1 a 3 min, e a recuperação não deve ultrapassar 5 min. No presente trabalho, as concentrações 50 e 75 mg L⁻¹ estão nesse intervalo, indicando-se 75 mg L⁻¹ por apresentar tempo de indução significativamente menor. As concentrações determinadas para a tilápia-do-nilo encontram-se dentro

do intervalo de valores já obtidos para outras espécies, de 25 a 150 mg L⁻¹ (Waterstrat, 1999; Woody et al., 2002; Grush et al., 2004; Mylonas et al., 2005; Roubach et al., 2005; Hajek et al., 2006; Vidal et al., 2007a, 2007b). A amplitude do intervalo de concentrações ideais é resultado das diferentes velocidades de ação do eugenol, para cada espécie de peixe (Hoskonen & Pirhonen, 2004). Segundo Coyle et al. (2004), outros anestésicos são eficientes para a anestesia da tilápia-do-nilo, com as seguintes concentrações: MS-222, 100 a 200 mg L⁻¹; benzocaína, 25 a 100 mg L⁻¹; quinaldina, 25 a 50 mg L⁻¹; e 2-fenoxietanol, 400 a 600 mg L⁻¹.

O custo da maior concentração terapêutica do eugenol por litro de água foi R\$ 0,065, valor inferior aos dos anestésicos MS-222 (R\$ 1,743), benzocaína (R\$ 0,077), quinaldina (R\$ 0,102) e 2-fenoxietanol (R\$ 0,134) (Sigma-Aldrich, 2008). Não há legislação internacional quanto à utilização de anestésicos químicos em peixes para consumo humano. Porém, países como os Estados Unidos da América (EUA) e a Nova Zelândia já possuem regulamentação quanto ao uso do eugenol, MS-222 e benzocaína. Nesses países, os peixes anestesiados com eugenol não necessitam de depuração. No entanto, nos EUA, os animais anestesiados com MS-222 e benzocaína devem ser depurados por 21 dias; na Nova Zelândia, para o MS-222 são necessários dez dias de depuração e não existe período específico para a benzocaína (Ross & Ross, 2008).

Após 600 s de exposição ao anestésico, as concentrações letais (CL) estimadas foram: CL01, 81,97 mg L⁻¹; CL50, 184,26 mg L⁻¹; e CL99, 286,55 mg L⁻¹. O índice terapêutico calculado – relação entre a CL50 (184,26 mg L⁻¹) e a concentração terapêutica (50 mg L⁻¹) para longo período de anestesia

Tabela 2. Estágios de recuperação anestésica⁽¹⁾.

Estágio	Resposta comportamental
I	Reaparecimento dos movimentos operculares
II	Retorno parcial do equilíbrio e da capacidade de nado
III	Recuperação total do equilíbrio
IV	Nado e reação a estímulos externos ainda vacilantes
V	Total recuperação do equilíbrio e capacidade normal de nado

⁽¹⁾Modificado de Hikasa et al. (1986).

Tabela 3. Tempo de indução e recuperação de juvenis de tilápia-do-nilo, expostos a diferentes concentrações de eugenol⁽¹⁾.

Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo de indução (s)	CV (%)	Tempo de recuperação (s)	CV (%)
50	133,80d	29,3	125,00a	43,2
75	82,70c	41,1	143,10a	45,0
100	56,90b	26,9	142,70a	19,3
150	52,80b	12,6	210,60ab	26,1
200	33,90ab	13,8	263,90b	55,9
250	27,80a	16,6	265,60b	16,9

⁽¹⁾Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

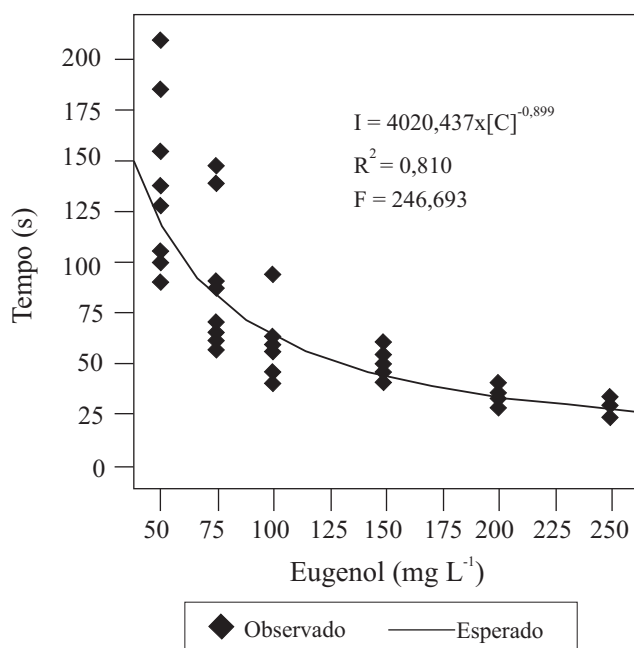


Figura 1. Curva de tempo de indução anestésica de eugenol, em juvenis de tilápia-do-nilo.

(600 s) – foi 3,69:1. Os valores de toxicidade aguda média e índice terapêutico para tilápia-do-nilo foram mais altos que os estimados para: carpa-comum (*Cyprinus carpio*), de 74,30 mg L⁻¹ e 2,5:1 (Velíšek et al., 2005b); truta arco-íris (*O. mykiss*), 81,10 mg L⁻¹ e 2,7:1 (Velíšek et al., 2005a); bagre-europeu (*Silurus glanis*), 76,70 mg L⁻¹ e 2,6:1 (Velíšek et al., 2006); e piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), 45,13 mg L⁻¹ e 1,8:1 (Vidal et al., 2007a). O eugenol também pode ser utilizado na eutanásia de peixes (Kildea et al., 2004). No presente trabalho, a exposição a 286,55 mg L⁻¹ por 600 s provocou 100% de mortalidade.

A exposição dos juvenis de tilápia-do-nilo à concentração de 75 mg L⁻¹ de eugenol, em diferentes intervalos de tempo, determinou os seguintes tempos de concentrações letais (TCL): TCL01, 566,97 s; TCL50, 1.611,66 s; e TCL99, 2.656,34 s. Estima-se que o tempo de exposição suficiente ao início de mortalidade (TCL01) seja 6,86 vezes maior do que a exposição terapêutica e a margem de segurança de 484,27 s. Vidal et al. (2007a) utilizaram 37,50 mg L⁻¹ de eugenol em juvenis de piavuçu (*L. macrocephalus*), em diferentes intervalos de tempo, e estimaram o TCL01 de 322,80 s, com margem de segurança de 257,60 s para a exposição terapêutica de 65,20 s.

Conclusões

1. Setenta e cinco miligramas de eugenol por litro de água são suficientes para a rápida indução anestésica da tilápia-do-nilo.
2. Estimam-se 184,26 mg L⁻¹ como a concentração letal média do eugenol aos 600 s.
3. A margem de segurança para a anestesia profunda, em banhos de imersão, é de 484,27 s.

Referências

- AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.743-748, 1999.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G. de; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.26, p.99-111, 2000.
- COLLINS, V.J. **Princípios de anestesiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 1194p.
- COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. **Anesthetics in aquaculture**. Texas: SRAC, 2004. 6p. (SRAC Publications, 3900).
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fish Stats Plus**: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, Italy, 2007.
- 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, p.46-53, 2004.
- HAJEK, G.J.; KLYSZEJKO, B.; DZIAMAN, R. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.36, p.93-97, 2006.
- HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.48, p.341-351, 1986.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.1136-1142, 2004.
- IGGO, A.; KLEMM, W.R. Nervos, sinapses e reflexos. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.699-713.
- INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazonica**, v.35, p.289-295, 2005.
- INOUE, L.A.K.A.; SANTOS NETO, C. dos; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, p.943-947, 2003.

- KEENE, J.L.; NOAKES, D.L.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.
- KILDEA, M.A.; ALLAN, G.L.; KEARNEY, R.E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v.232, p.265-277, 2004.
- MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v.10, p.2-5, 1985.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.231-238, 2003.
- 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, p.467-481, 2005.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 236p.
- 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, p.1056-1061, 2005.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
- SIGMA-ALDRICH. **Cotações e pedidos**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/Brazil/Cotaes_e_Pedidos.html>. Acesso em: 20 jul. 2008.
- SPSS INCORPORATION. **SPSS for Windows statistical package for the social sciences**: release 13.0. Chicago, 2004.
- VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V. Effects of clove oil on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria BRNO**, v.74, p.139-146, 2005a.
- VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V.; GROCH, L.; NEPEJCHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinární Medicína**, v.50, p.269-275, 2005b.
- VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L.; ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria BRNO**, v.75, p.99-106, 2006.
- VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SANTOS, L.D. dos; SOARES, C.M. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p.357-362, 2007a.
- VIDAL, L.V.O.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S.; SCHAMBER, C.R.; SILVA, L.C.R. da; SANTOS, L.D. dos; SOUZA, S.R. de. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.335-342, 2007b.
- WATERSTRAT, P.R. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.30, p.250-255, 1999.
- WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.340-347, 2002.
- YANG, B.H.; PIAO, Z.G.; KIM, Y.B.; LEE, C.H.; LEE, J.K.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.

Recebido em 29 de fevereiro de 2008 e aprovado em 31 de julho de 2008