

# Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol

Lívia Gruli Barbosa<sup>1</sup>, Gilberto Moraes<sup>1</sup> e Luis Antônio Kioshi Aoki Inoue<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amazônia Ocidental, Rod. AM 010, km 29, 69011-970, Manaus, Amazonas, Brasil. \*Autor para correspondência. Email: luis.inoue@cpaa.embrapa.br

**RESUMO.** O matrinxã (*Brycon amazonicus*) é uma espécie de interesse comercial. Porém, este peixe movimenta-se em excesso durante práticas de manejo, podendo sofrer ferimentos e perdas de escamas que, muitas vezes, resultam em taxas elevadas de mortalidade. O eugenol, principal componente do óleo de cravo, tem sido bastante utilizado como um anestésico alternativo para peixes por ser um produto natural e de baixo custo. Entretanto, estudos que tratam de respostas metabólicas, em peixes tropicais expostos a diferentes anestésicos, são ainda necessários. Dentro deste intuito, o presente trabalho avaliou respostas metabólicas do *Brycon amazonicus* ao eugenol, em simulações de banhos anestésicos. A demanda metabólica do matrinxã foi suprida principalmente pelo catabolismo de aminoácidos. Respostas típicas ao estresse foram detectadas por causa do manuseio imposto aos peixes para a realização dos banhos anestésicos. O eugenol não reduziu totalmente essas reações ao estresse. Por outro lado, esse anestésico não provocou estresse adicional em virtude de sua presença em exposições curtas de até 60 mg L<sup>-1</sup> por 10 min. O eugenol proporciona segurança aos trabalhadores durante práticas de manejo, sem maiores prejuízos ao matrinxã.

**Palavras-chave:** *Brycon amazonicus*, metabolismo, eugenol, anestésico.

**ABSTRACT. Metabolic responses of matrinxã to eugenol in anesthetic baths.** Matrinxã (*Brycon amazonicus*) is a commercial fish that presents excessive movements during handling. This characteristic predisposes the animals to injuries and losses of scales that may result in high mortality rates. Eugenol, the main component of clove oil, has been reported as an alternative fish anesthetic because it is a natural product and cheap. However, studies remain necessary about the metabolic responses of tropical fishes to anesthetics. The present work evaluated metabolic responses of *Brycon amazonicus* to eugenol in simulated anesthetic baths. The fish metabolic demand was supplied mainly by amino acids catabolism. Typical metabolic stress responses to handling were detected but eugenol could not totally reduce them. On the other hand, the anesthetic dissolved in the water did not provoke any extra charge of stress during short-term exposures up to 60 mg L<sup>-1</sup> for 10 min. Eugenol provides safety to the workers in handling of matrinxã.

**Key words:** *Brycon amazonicus*, metabolism, eugenol, anesthetic.

## Introdução

O matrinxã (*Brycon amazonicus*) é uma espécie de grande interesse para a piscicultura comercial (Saint-Paul, 1986). Porém, este peixe movimenta-se em excesso durante o manejo, o que pode levar a ferimentos e perdas de escamas. Isso pode resultar na manifestação de doenças provocadas por microrganismos e/ou a morte. Além do mais, os movimentos bruscos dos animais colocam em risco também a segurança dos trabalhadores, principalmente quando manuseando equipamentos como: bisturis, agulhas, balanças eletrônicas etc. Esse risco aumenta quando os peixes são de grande porte.

Assim, o uso de anestésicos é imperativo para fins de segurança durante práticas de manejo como: biometrias, marcações, injeções etc.

O eugenol, principal componente do óleo de cravo, tem sido relatado como um anestésico alternativo para peixes (Munday e Wilson, 1997; Cho e Heath, 2000; Woody *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Roubach *et al.*, 2005). Até o momento, não foram encontrados traços tóxicos deste produto em animais aquáticos previamente expostos a ele, além do fato de que outras áreas como: a odontologia, a indústria de alimentos e a fabricação de perfumes têm vasto uso do produto para humanos, sem a constatação de riscos, inclusive ambientais. O

eugenol é um composto orgânico seguro e não-mutagênico e totalmente eliminado da corrente sanguínea e do tecido muscular de peixes em menos de dois dias após o seu uso (Sladky *et al.*, 2001; Woody *et al.*, 2002; Kildea *et al.*, 2004). De acordo com os autores Soto e Burhanuddin (1995), Tort *et al.* (2002), Kildea *et al.* (2004) e Inoue *et al.* (2005), o eugenol pode reduzir o estresse em peixes, além de apresentar efeitos anti-sépticos.

Um trabalho já foi realizado com o matrinxã que avaliou tempos de indução à anestesia em diferentes concentrações de óleo de cravo (Inoue *et al.*, 2003). Outro estudo relata efeitos de prevenção ao estresse em matrinxã submetido ao transporte (Inoue *et al.*, 2005). Porém, mais dados são ainda necessários a respeito da utilização do eugenol para o matrinxã, especificamente em banhos anestésicos, pois dependendo da dose e do tempo de exposição utilizado, o próprio anestésico pode ser prejudicial aos peixes, com a observação de conseqüências desastrosas, como morte instantânea de animais por superdosagem e/ou recuperação inadequada à anestesia (Iwama e Ackerman, 1994). O presente trabalho teve por objetivo avaliar respostas metabólicas do matrinxã, simulando-se banhos anestésicos com eugenol. Os dados fornecem informações úteis a respeito da viabilidade de uso desse anestésico durante práticas de manejo, além de dar informações elementares a respeito dos ciclos bioquímicos mais utilizados pelo matrinxã em banhos anestésicos.

## Material e métodos

### Instalações

Cento e vinte juvenis de matrinxã (peso de  $126,7 \pm 1,3$  g e comprimento total de  $20,8 \pm 0,01$  cm), doados pela Piscicultura Águas Claras, Mococa, Estado de São Paulo, foram estocados em 12 caixas de 250 L, em uma densidade de 10 peixes caixa<sup>-1</sup>, nas instalações do Departamento de Genética e Evolução, da Universidade Federal de São Carlos, Estado de São Paulo. O abastecimento de água nos tanques foi em sistema fechado de circulação, munido de filtro de areia e aquecedor central para manutenção da qualidade da água (temperatura  $25,7 \pm 0,9$ °C, oxigênio dissolvido  $5,7 \pm 0,07$  mg L<sup>-1</sup>, pH 6,8 e condutividade  $74,3 \pm 4,8$   $\mu$ S cm<sup>-1</sup>). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, até perto da saciedade, com ração comercial, contendo 30% de proteína bruta. Vinte e quatro horas antes do início do experimento, a alimentação foi suspensa.

### Procedimentos experimentais

Os 12 tanques experimentais foram numerados e

sorteados para constituir quatro tratamentos com três repetições cada: T1 – controle, T2 – banho, T3 – banho e anestesia, T4 – banho e anestesia profunda. Peixes do grupo-controle (T1) foram somente amostrados. O procedimento experimental adotado nos grupos T2, T3 e T4 foram similares. Os peixes do grupo T2 foram transferidos, respectivamente, das três caixas de estocagem inicial para três aquários de 30 L cada, sem a adição de qualquer produto. Esses peixes permaneceram por 10 min em banho simulado, e após esse período, foram retornados às condições iniciais. Os peixes dos grupos T3 e T4 sofreram o mesmo manejo adotado em T2, exceto pelo fato de que os aquários continham, respectivamente, 15 e 60 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, previamente diluídos em etanol 1:20. As concentrações utilizadas são conhecidas para a indução à anestesia em matrinxã, caracterizada pela perda total de equilíbrio com incapacidade de retornar à posição normal de nado, em 10 e 1 min (Inoue *et al.*, 2003). Doses inferiores somente tranquilizam o matrinxã, sendo úteis para o transporte (Inoue *et al.*, 2005).

Amostragens de peixes foram realizadas em dois momentos distintos: 0 e 24 horas, após os procedimentos experimentais descritos acima. Essas amostragens tiveram a finalidade de avaliar o metabolismo do matrinxã, logo após a imposição dos banhos anestésicos e depois de um período de recuperação de um dia. Em cada amostragem, três peixes foram coletados por caixa, e sacrificados de forma instantânea por depressão cerebral (CCAC, 2003). O sangue foi coletado por punção caudal, utilizando-se seringas previamente heparinizadas. Alíquotas de sangue foram centrifugadas a  $14400 \times G$  por 3 min para separação de plasma, e em seguida foram estocadas em nitrogênio líquido. Pedacos de fígado e músculo branco foram, também, coletados e imediatamente congelados. Peixes remanescentes, nos tanques experimentais, foram descartados.

### Análises bioquímicas

Alíquotas de plasma foram submetidas às determinações colorimétricas de glicose (Trinder, 1969), lactato (Harrower e Brown, 1972), proteína total (Kruger, 1994), amônia total (Gentzkow e Mazen, 1942) e cloreto (Apha, 1980). Concentrações plasmáticas de sódio (Na) e potássio (K) foram determinadas em fotômetro de chama. Amostras de fígado e músculo branco foram submetidas à determinação do glicogênio, segundo Bidinotto *et al.* (1997).

### Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância

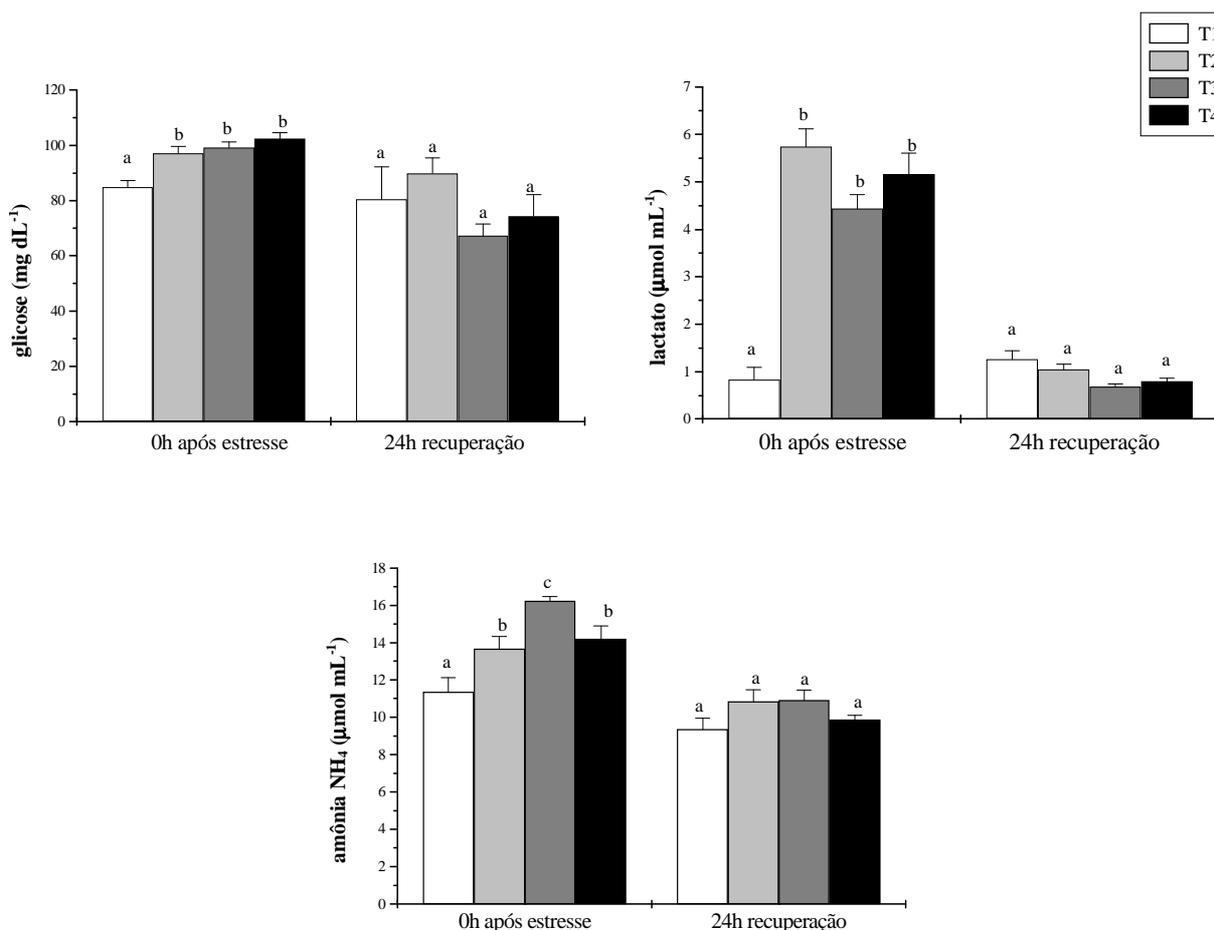
(“Anova bifatorial”). E, quando o valor de F indicava significância ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias por tratamento, observadas logo após a imposição dos banhos anestésicos aos peixes (0 horas) e, também, depois de 24 horas de recuperação.

## Resultados

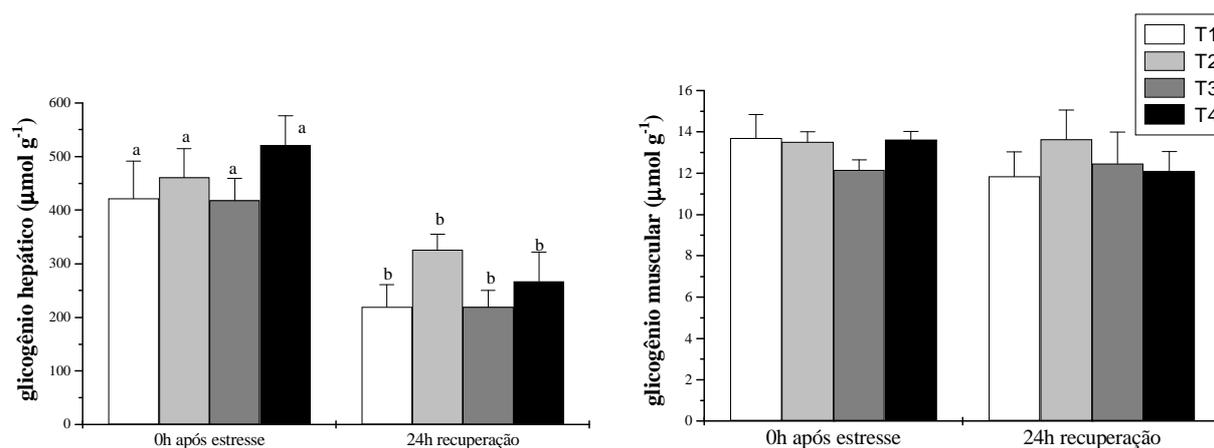
Não foi observada mortalidade de peixes durante o presente trabalho. Os valores plasmáticos de glicose ( $F = 4,424$ ;  $p = 0,0005$ ), lactato ( $F = 62,701$ ;  $p = 0,0001$ ) e amônia ( $F = 15,248$ ;  $P = 0,0001$ ) apresentaram elevações significativas em resposta ao manuseio imposto aos peixes para a realização dos banhos sem anestésico (T2) e com eugenol (T3 e T4). Diferenças significativas não foram observadas entre os tratamentos T3 e T4 (Figura 1), exceto para a variável da amônia plasmática. Vinte e quatro horas após os procedimentos experimentais, os valores de glicose, lactato e amônia plasmática apresentaram-se

recuperados em T2, T3 e T4, sem diferenças dos valores observados em relação ao grupo-controle T1. Os valores de glicogênio permaneceram constantes 0 horas após os procedimentos experimentais. Vinte e quatro horas depois, foram observadas quedas dos valores de glicogênio hepático em T1, T2, T3 e T4, em relação a todos os valores observados no começo do experimento ( $F = 5,199$ ;  $p = 0,0001$ ). Os valores de glicogênio muscular permaneceram constantes ( $F = 0,580$ ;  $p = 0,7693$ ) durante todo o experimento (Figura 2).

Os valores de sódio ( $\text{Na}^+$ ) plasmático apresentaram pequena redução ( $F = 0,679$ ;  $p = 0,7012$ ) de  $165,8 \text{ mEq L}^{-1}$  no grupo-controle T1 para  $158,6 \text{ mEq L}^{-1}$  em T2, T3 e T4. As demais variáveis relacionadas ao balanço eletrolítico dos peixes permaneceram constantes  $\{\text{Cl}^- = 40,6 \text{ mEq L}^{-1}$  ( $F = 0,620$ ;  $p = 0,7621$ );  $\text{K}^+ = 3,6 \text{ mEq L}^{-1}$  ( $F = 0,495$ ;  $p = 0,8031$ ); proteína total =  $72 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $F = 0,521$ ;  $p = 0,7992$ )}.



**Figura 1.** Respostas plasmáticas do matrinxã (*Brycon amazonicus*) ao eugenol em banhos anestésicos de 10 min. Peixes foram amostrados 0 e 24 horas após os procedimentos experimentais. T1 – tratamento controle de peixes somente amostrados, T2 – peixes transferidos para aquários sem anestésico, T3 – banho anestésico de  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , T4 – banho anestésico de  $60 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 2.** Glicogênio hepático e muscular em matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetido ao eugenol em banhos anestésicos por 10 min. Peixes foram amostrados 0 e 24 horas após os procedimentos experimentais. T1 – tratamento controle de peixes somente amostrados, T2 – peixes transferidos para aquários sem anestésico, T3 – banho anestésico de 15 mg L<sup>-1</sup>, T4 – banho anestésico de 60 mg L<sup>-1</sup>.

## Discussão

O manuseio direto de peixes é conhecido como agente estressor agudo, pois rompe o equilíbrio dos animais com o ambiente de cultivo (homeostase), iniciando as respostas metabólicas típicas ao estresse. Este, quando em intensidade e duração excessiva, pode resultar em manifestação de doenças em toda a população e, também, na morte de animais (Iwama *et al.*, 2004).

O efeito dos anestésicos, como redutor de estresse em peixes, é controverso, uma vez que respostas ao próprio anestésico têm também sido observadas em peixes expostos a Tricaina Metano Sulfonato (MS 222), óleo de cravo, metomidato, benzocaína, gás carbônico e fenoxietanol (Tort *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2003; Pirhonen e Schreck, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Os procedimentos experimentais, utilizados no presente trabalho, tiveram o objetivo de simular as condições em que o eugenol é utilizado no campo. Assim, a transferência direta dos peixes das caixas de estocagem inicial para os aquários e as respectivas voltas foram estímulos adversos suficientes para iniciar as respostas ao estresse, que ficou evidente ao se observar os aumentos de glicose, de lactato e amônia do plasma em T2, 0 horas após os procedimentos experimentais.

Esses aumentos plasmáticos são interpretados tão logo o cérebro detecte um ou mais estímulos adversos, dois eixos fisiológicos são ativados: CPI (cérebro-pituitária-inter renais) e CSC (cérebro, células simpáticas de cromafina). Cortisol e catecolaminas são liberados na corrente sanguínea, iniciando os processos metabólicos para a produção de energia extra, para o peixe fugir ou adaptar-se às novas condições (Iwama *et al.*, 2004). As respostas plasmáticas observadas no presente trabalho não puderam ser reduzidas pelo eugenol. Por outro lado,

os resultados de T3 e T4 indicam que o anestésico testado não provocou resposta metabólica ao estresse de maneira adicional.

Hiperglicemia plasmática em peixes é ferramenta importante para os estudos de estresse em condições de campo, similares às do presente trabalho (Hattingh, 1976). Assim, o aumento da glicose em relação ao grupo-controle sem estresse é indicador seguro de resposta metabólica aumentada, mediada pelo cortisol, sendo esse fato extensivamente descrito na literatura (Mommsen *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 2004). Entretanto, a dosagem do cortisol plasmático, em peixes no Brasil, é muitas vezes economicamente inviável. Roubach *et al.* (2001) detectaram aumento adicional da glicemia em matrinxã, quando submetido a banho anestésico com MS 222 em concentrações acima de 150 mg L<sup>-1</sup>. A benzocaína proporcionou, na mesma espécie, redução da hiperglicemia durante banhos anestésicos, em concentrações de até 60 mg L<sup>-1</sup> por 10 min (Inoue *et al.*, 2004).

A movimentação excessiva dos animais durante o manejo induz a maior demanda por energia. Dessa maneira, o metabolismo aeróbico sozinho não é capaz de sustentar todas as necessidades do organismo. As reações metabólicas anaeróbicas e seu principal produto ficaram evidenciados, quando observados os aumentos do lactato plasmático em T2, T3 e T4, 0 horas após os procedimentos experimentais (Hochachka, 1980). Inoue *et al.* (2004) observaram, em matrinxã, diminuição das concentrações de lactato durante o manejo, ao utilizar a benzocaína ou o fenoxietanol em banhos de até 60 e 600 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No presente trabalho, o eugenol também proporcionou teores menores de lactato, entretanto, as diferenças não foram significativas.

Era esperado que a glicogenólise fosse a principal via de suprimento de energia ao matrinxã durante os procedimentos experimentais. Entretanto, quedas nos valores de glicogênio foram somente observadas 24 horas após. Isso leva a supor que o metabolismo de carboidratos foi mais utilizado pelo matrinxã para tolerar o período de jejum durante as 48 horas correspondentes à última alimentação e o fim do experimento. Em adição, o aumento da amônia plasmática é, também, conhecido como indicador de metabolismo de proteínas alterado por mediação do cortisol, que estimula as taxas de transaminações, resultando em maior liberação desse metabólito no plasma. Porém, outro fator pode estar contribuindo para o aumento dos níveis de amônia plasmática durante os procedimentos experimentais. Peixes em condições de estresse sofrem alterações dos parâmetros respiratórios e cardíacos. Assim, é esperado que as taxas de passagem de água e sangue pelas brânquias fiquem alteradas, podendo dificultar a excreção de compostos nitrogenados.

De igual maneira, o equilíbrio de sais no plasma pode ser alterado em resposta às mudanças da quantidade de água e sangue que passam pelas brânquias, alterando, também, as trocas de íons entre os meios interno e externo (McDonald e Milligan, 1997). No presente estudo, as concentrações de sódio, cloreto, potássio e proteína plasmática mantiveram-se praticamente constantes, o que indica que os procedimentos experimentais aparentemente não tiveram intensidade nem duração suficientes para induzir alterações no balanço eletrolítico do matrinxã. A prática de transporte provoca alterações iônicas marcantes em matrinxã (Urbinati *et al.*, 2004; Inoue e Moraes, 2006). Na maioria dos casos, o transporte é um estímulo adverso mais severo e longo que a realização de banhos anestésicos.

### Conclusão

Dentro das condições do presente trabalho, é possível concluir que o eugenol é um anestésico adequado para o matrinxã. Este produto proporciona segurança para os trabalhadores durante a implementação de práticas de manejo (biometria, injeções, marcações etc), sem a observação de estresse adicional nos peixes por sua presença, em concentrações de até 60 mg L<sup>-1</sup> por 10 min. Além disso, os peixes apresentaram-se recuperados em 24 horas após os procedimentos experimentais.

### Agradecimentos

Fundos do Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico, CNPq (150666/2005-5), por financiar o presente trabalho. Ao Prof. Dr. Cristiano dos Santos Neto (DEBE/Ufscar), pelas análises estatísticas. E aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/Ufscar), pela assistência durante o experimento e análise do material biológico.

### Referências

- APHA. *Standard methods for determinations of water and wastes*. 12<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: Joint Editorial Board, 1980.
- BIDINOTTO, P.M. *et al.* Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of microsamples. *Bol. Tec. CEPTA*, Pirassununga, v. 10, p. 53-60, 1997.
- CCAC-Canadian Council on Animal Care. *Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing*. 2<sup>nd</sup> ed. Ottawa: CCAC, 2003.
- CHO, G.K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Res.*, Oxford, v. 31, p. 537-546, 2000.
- GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 143, p. 531-544, 1942.
- HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid: a micromethod adaptes to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.*, Bethesda, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. *J. Fish Biol.*, Oxford, v. 10, p. 191-195, 1976.
- HOCHACHKA, P.W. *Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance*. Cambridge: Harvard University Press, 1980.
- INOUE, L.A.K.A. *et al.* Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L.A.K.A. *et al.* Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaina no manejo do matrinxã (*Brycon cephalus*). *Biodiversidade Pampeana*, Uruguaiana, v. 2, p. 10-15, 2004.
- INOUE, L.A.K.A. *et al.* Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.
- INOUE, L.A.K.A.; MORAES, G. Stress responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) submitted to transport in plastic bags. *J. Fish. Aquat. Sci.*, Washington, D.C., v. 1, n. 1, p. 1-9, 2006.
- IVERSEN, M. *et al.* The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 221, p. 549-566, 2003.

- IWAMA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, T. (Ed.). *Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. v. 3, cap. 1, p. 1-15.
- IWAMA, G. et al. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.*, Washington, D.C., v. 204, p. 15-19, 2004.
- KILDEA, J. et al. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S<sup>TM</sup> from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bityanus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 232, p. 265-277, 2004.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol. Biol.*, Totowa, v. 32, p. 9-15, 1994.
- MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.K. et al. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 119-144.
- MOMMSEN, T. et al. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Rev. Fish. Biol. Fisher.*, Amsterdam, v. 9, p. 211-268, 1999.
- MUNDAY, P.L.; WILSON, S.K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish Biol.*, Oxford, v. 51, p. 931-938, 1997.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C.B. Effects of anesthesia with MS 222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.
- ROUBACH, R. et al. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 31, n. 1, p. 159-163, 2001.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Res.*, Oxford, v. 36, p. 1056-1061, 2005.
- SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 54, p. 205-240, 1986.
- SLADKY, K. et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anaesthetic in red pacu (*Piaractus brachyomus*). *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.
- SOTO, C.; BURHANUDDIN, G. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 136, p. 149-152, 1995.
- TORT, L. et al. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Res.*, Oxford, v. 33, p. 907-910, 2002.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Anal. Clin. Biochem.*, Amsterdam, v. 6, p. 24-27, 1969.
- URBINATI, E. et al. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 229, p. 389-400, 2004.
- WAGNER, G. et al. The ability of clove oil and MS222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Res.*, Oxford, v. 34, p. 1139-1146, 2003.
- WOODY, C.A. et al. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J. Fish Biol.*, Oxford, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.

Received on April 25, 2007.

Accepted on July 25, 2007.