

Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*)

Luiz Vítor Oliveira Vidal^{2*}, Wilson Massamitu Furuya¹, Thêmis Sakaguti Graciano², Christiano Rodrigues Chamber², Lilian Dena dos Santos² e Claudemir Martins Soares³

¹Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

³Núcleo de Pesquisas em Limnologia e Aqüicultura, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: luizvitor.vidal@gmail.com

RESUMO. Três trabalhos foram realizados para avaliar a capacidade anestésica do eugenol em juvenis de piavuçu, determinando influência das concentrações do anestésico na indução e recuperação, sua toxicidade aguda para a espécie e o tempo máximo de imersão para juvenis de piavuçu. Foram utilizados 441 peixes ($1,77 \pm 0,69$ g), sendo 72 submetidos a oito concentrações diferentes (25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100; 125 e 150 mg L⁻¹), 150 peixes foram submetidos a cinco concentrações de eugenol (25; 37,5; 50; 62,5; 75 mg L⁻¹) durante 600 segundos e 150 submetidos a 37,5 mg L⁻¹ durante cinco intervalos (300; 600; 900; 1200; 1500 segundos). Foi constatada influência das concentrações no efeito do anestésico sobre os peixes, as CL aos 600 segundos foram CL01 25,21 mg L⁻¹, CL50 45,13 mg L⁻¹, CL99 65,05 mg L⁻¹ e os Tempos de Concentrações Letais (TCL) estimados foram TCL01 322,8 segundos, TCL50 854,9 segundos e TCL99 1386,9 segundos. Concluiu-se que 37,5 mg L⁻¹ são suficientes para a anestesia profunda da espécie, induzindo anestesia em apenas um minuto com margem de segurança.

Palavras-chave: anestesia, CL50, eugenol, piavuçu.

ABSTRACT. Eugenol concentrations for deep anesthesia and acute toxicity in piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) juveniles. Three works were undertaken to evaluate the anesthetic capacity of eugenol in “piavuçu” juveniles; the influence of different concentrations on the anaesthetic effect, the acute toxicity (LD 50) and the Time for Lethal Dose (TLD) for the species. Seventy-two fish (1.77 ± 0.69 g) were submitted to eight different eugenol concentrations (25; 37.5; 50; 62.5; 75; 100; 125 and 150 mg L⁻¹); 150 fish were submitted to five concentrations (25; 37.5; 50; 62.5; 75 mg L⁻¹) for ten minutes; and 150 fish were submitted to 37.5 mg/L for five time intervals (300; 600; 900; 1200; 1500 seconds). Eugenol concentration had strong influence on the anesthetic effect for the species; LD for 600 seconds of exposure were LD01 25.21 mg L⁻¹, LD50 45.13 mg L⁻¹ and LD99 65.05 mg L⁻¹. The TLD were TLD01 322.8 seconds, TLD50 854.9 seconds and TLD99 1386.9 seconds. For fast and safe anesthesia of piavuçu juveniles, 37.5 mg L⁻¹ of eugenol is recommended.

Key words: anesthesia, LD50, eugenol, piavuçu.

Introdução

A aqüicultura, na qual está inserida a piscicultura, é o segmento da produção animal que mais cresce no cenário mundial atual (Ono e Kubitz, 2003). Os peixes são facilmente estressados durante o manejo e transporte, e o simples contato dos animais com o ar atmosférico, durante a biometria, é suficiente para desencadear uma reação de estresse (McGee e Cichra, 2002).

Substâncias anestésicas são freqüentemente utilizadas para reduzir a hipermotilidade, que é uma

fonte considerável de machucaduras durante procedimentos de manejo e/ou transporte (Inoue *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2006). A indução deve levar de 1 a 3 minutos e a recuperação não deve ultrapassar 5 minutos, quando se considera a anestesia necessária à biometria (Roubach e Gomes, 2001).

O chamado “óleo-de-cravo” é um produto vegetal muito conhecido, que já teve mais aplicações do que hoje na medicina popular (Lapemm, 2005). É um composto fenólico resultado da destilação das folhas, flores (incluindo talos) das árvores de cravo da Índia (*Syzygium Aromaticum*), sendo a substância ativa o

eugenol, com concentração que varia de 70 a 95% da composição total do óleo essencial do cravo (Mazzafera, 2003). Os estudos sobre a utilização do eugenol, como anestésico em aquíicultura, surgiram da necessidade de se encontrar novas substâncias eficazes, seguras e de baixo custo (Roubach et al., 2005).

Alguns estudos já relatam o êxito em utilizar o eugenol como anestésico para matrinxã, *Brycon cephalus* (Inoue et al., 2003), tambaqui, *Colossoma macropomum* (Roubach et al., 2005), pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Vidal et al., 2006), jundiá, *Rhamdia quelen* (Cunha et al., 2006) e robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* (Souza-Junior e Alves-Junior, 2006), como a capacidade da substância em reduzir o estresse de transporte e manuseio (Inoue et al., 2005; Cunha et al., 2006).

O piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), espécie nativa da bacia do Paraguai e Paraná, apresenta boa aceitação no mercado, conhecido na pesca esportiva e por colecionadores de peixes ornamentais. Esta espécie apresenta comportamento agitado durante o manejo em que se encontram restrito a pequenos espaços, podendo apresentar ferimentos ao final dos procedimentos (Tataje e Zaniboni Filho, 2005).

Os objetivos destes trabalhos foram avaliar a influência das concentrações do eugenol como anestésico na indução e recuperação, sua toxicidade aguda (Concentração Letal) e o tempo máximo de imersão para juvenis de piavuçu.

Material e métodos

Foram realizados três trabalhos no Laboratório de Aquíicultura da Universidade Estadual de Maringá, durante o período de março a abril de 2007. Para todos os trabalhos, foram utilizados 441 juvenis de piavuçu (1,77 ± 0,69 g). Para adaptação, os peixes foram mantidos em duas caixas de 250 L durante sete dias, com aeração constante, sendo fornecida ração extrusada (Supra Peixe Juvenil®) com 42% de proteína bruta, desintegrada em moedor de carne, selecionando-se os grânulos retidos em malha de um milímetro. Os peixes foram alimentados à vontade duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 horas, sete dias por semana. Diariamente, foi realizada sifonagem para retirada de fezes e ração não consumida, sendo renovada 10% da água do tanque. A temperatura durante a aclimação variou de 23 a 25°C.

Para todos os ensaios, foram utilizados aquários de vidro com volume útil de 20 litros, contendo quatro litros de água. A temperatura da água foi mantida em 25 ± 1°C, enquanto o oxigênio dissolvido foi mantido entre 6 ± 0,5 mg L⁻¹. Em cada aquário, foi mantido um sistema de aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador. A temperatura da água e o oxigênio

dissolvido foram monitorados por meio de *kit* digital portátil (Bernauer YSI-1055). Em cada experimento, foi utilizado um grupo-controle. Os peixes foram mantidos em água livre do anestésico para monitoramento dos parâmetros comportamentais e possível mortalidade durante os procedimentos.

O Eugenol® (Biodinâmica) devido a sua natureza oleosa, foi diluído em álcool etílico (92,8°), resultando em solução estoque na proporção de 100 mg mL⁻¹.

Influência da concentração no efeito anestésico do eugenol

Para determinar a influência da concentração na indução e a recuperação anestésica dos animais, foram testados oito tratamentos (25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100; 125 e 150 mg L⁻¹ de eugenol). Para cada tratamento, foram utilizados nove juvenis (n = 9), coletados aleatoriamente e submetidos, um a cada vez, ao banho anestésico, totalizando 72 peixes. O parâmetro observado para a indução foi a ausência de movimentos dos animais no fundo do aquário. Em seguida, foi estabelecido o estágio anestésico atingido pelo animal, seguindo-se a metodologia proposta por Ross e Ross (1999), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. 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

Modificado de Ross e Ross (1999).

Após indução, todos peixes foram pesados (Balança digital portátil, 0,01 g) e medidos individualmente (paquímetro Mitutoyo, 0,01 cm) para simular um procedimento de rotina no campo. Nessa pesagem, foi aferida a média do lote. A recuperação anestésica foi realizada individualmente em aquário contendo água sem eugenol. O retorno total do equilíbrio foi utilizado como parâmetro comportamental adotado e indicativo da recuperação, sendo este o estágio estabelecido por Hikasa et al. (1986).

Na Tabela 2 encontram-se os estágios de recuperação em peixes e os parâmetros comportamentais correspondentes.

Tabela 2. Estágios de recuperação anestésica.

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 para estímulos externos ainda vacilantes
V	Total recuperação do equilíbrio e capacidade normal de nado

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

Os tempos necessários, para o aparecimento dos padrões comportamentais avaliados, foram monitorados por meio de cronômetro digital.

Concentração letal aos 600 segundos de exposição

Para a determinação da Concentração Letal (CL), foram testadas cinco diluições do anestésico (25; 37,5; 50; 62,5; 75 mg L⁻¹), cada uma com três repetições. Para cada repetição, foram utilizados 10 peixes (n = 10), totalizando 150 peixes expostos às soluções anestésicas durante 600 segundos, seguindo-se a metodologia descrita por Valisek *et al.* (2005a).

Tempo de concentração letal na anestesia profunda

Para esse teste, foi utilizada a concentração de 37,5 mg L⁻¹ sendo avaliados os tempos de exposição à concentração de eugenol de 300; 600; 900; 1.200 e 1.500 segundos. Para cada tratamento, foram realizadas três repetições com dez peixes por unidade experimental, totalizando 150 peixes.

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

Análise estatística

Para a análise estatística do efeito da concentração do eugenol sobre os peixes, a média dos valores encontrados foi comparada por meio de análise de variância (ANOVA critério único) e, com a indicação de valores significativos em nível de 5%. Para identificação das diferenças entre as concentrações, foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), para a comparação das médias de cada concentração de anestésico utilizadas. A correlação entre as concentrações e o efeito do anestésico foi determinada por meio do teste de Spearman com a indicação de valores significativos em nível de 1%. 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 análises foram realizadas

utilizando-se o programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS, 2004).

Resultados e discussão

Durante os ensaios, em todos tratamentos, os peixes apresentaram reação de hiperatividade ao primeiro contato com o anestésico, evidenciada pela rápida movimentação no aquário, que diminuía à medida que o efeito do anestésico se instalava. Em todas concentrações, os peixes atingiram o padrão comportamental observado na indução anestésica. Na concentração de 25 mg L⁻¹, alguns peixes ainda apresentaram reações aos estímulos externos ao serem retirados da água. Isso indicou que atingiram apenas o estágio anestésico III (narcose), sendo que, nas concentrações seguintes, todos atingiram o estágio anestésico IV (anestesia profunda).

A hiperatividade observada também foi relatada por Grush *et al.* (2004) e Vidal *et al.* (2006). 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. De acordo com Collins (1978), a euforia é o primeiro comportamento observado em um animal submetido à anestesia geral.

Nos trabalhos conduzidos por Waterstrat (1999) e Vidal *et al.* (2006), na concentração de 25 mg L⁻¹ não foi possível induzir anestesia profunda em alevinos de bagre do canal *Ictalurus punctatus* e juvenis de pintado *Pseudoplatystoma corruscans*. Esses autores não detectaram redução dos movimentos operculares após 600 segundos de exposição ao eugenol.

As menores concentrações testadas (25; 37,5; 50 e 62,5 mg L⁻¹) apresentaram diferença significativa na indução anestésica. Nas três últimas concentrações, não foi observada diferença. A recuperação dos animais foi mais lenta à medida que foi aumentada a concentração. Os períodos necessários para indução e recuperação dos animais encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Tempo de indução e recuperação dos juvenis de piavuçu expostos diferentes concentrações de eugenol.

Concentração (mg L ⁻¹)	Indução (segundos)	Recuperação (segundos)
25	112,3 ± 17,4 ^e	96,9 ± 19,6 ^e
37,5	65,2 ± 10,6 ^d	122,3 ± 27,3 ^{ab}
50	51,4 ± 8,9 ^c	152,1 ± 53,4 ^b
62,5	38,4 ± 8,7 ^b	168,3 ± 46,5 ^{bc}
75	35,7 ± 5,7 ^b	209,7 ± 56,8 ^{cd}
100	21,6 ± 2,6 ^a	216,9 ± 46,3 ^{cd}
125	15,9 ± 4,1 ^a	254,8 ± 52,2 ^d
150	15,4 ± 2,2 ^a	258,0 ± 23,5 ^d

Médias seguidas das mesmas letras, na mesma coluna, não diferem entre si (p > 0,05) utilizando o teste SNK.

Diversos autores constataram redução, no tempo necessário, para a anestesia de peixes à medida que se elevou a concentração (Keene et al., 1998; Waterstrat, 1999; Inoue et al., 2003; Vidal et al., 2006). Observaram também menor influência das concentrações na recuperação dos animais.

As correlações encontradas entre as concentrações e as respostas de indução e recuperação dos animais foram -0,957 e 0,811, respectivamente. Os modelos encontrados para a indução e recuperação dos peixes obedecem às equações $I = 4302,528x[C]^{-1,141}$ e $R = 14,929x[C]^{0,580}$, em que I é o tempo necessário para a indução, R o tempo necessário para recuperação (em segundos) e [C] a concentração utilizada. Para a equação de indução, o R^2 foi 0,926 e o F = 873,348; na recuperação o R^2 foi 0,663 e o F = 137,633, em concentrações que foram de 25 à 150 mg L⁻¹. As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas de concentração-efeito para juvenis de piavuçu.

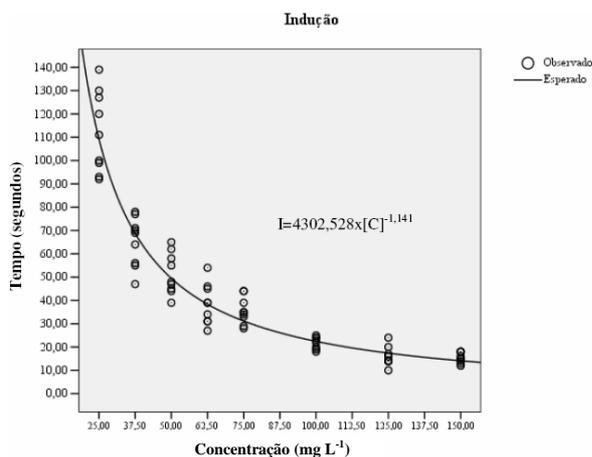


Figura 1. Tempo indução ao eugenol por juvenis de piavuçu.

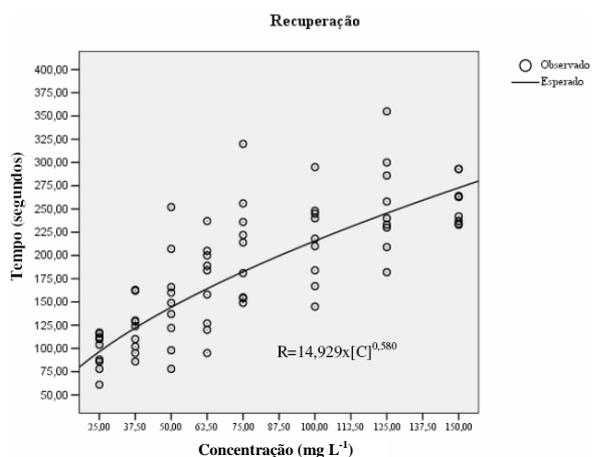


Figura 2. Tempo recuperação ao eugenol por juvenis de piavuçu.

A curva de regressão obtida para a indução

anestésica obedece ao mesmo modelo matemático encontrado por Inoue et al. (2003). Esses autores observaram queda elevada nas primeiras concentrações, com tendência à estabilidade nas últimas, assim como observado no presente trabalho.

As concentrações mais eficazes para a anestesia profunda, no atual trabalho, encontram-se dentro do intervalo proposto para algumas espécies como o salmão do Atlântico *Salmo solar*, 10-50 mg L⁻¹, truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, 40-120 mg L⁻¹, carpa comum *Cyprinus carpio*, 40-100 mg L⁻¹ (Coyle et al., 2005). Trabalhos realizados com outras espécies nativas do Brasil apontam valores semelhantes aos encontrados para juvenis de piavuçu: matrinxã *Brycon cephalus*, 40-50 mg L⁻¹ (Inoue et al., 2003); pintado *Pseudoplatystoma corruscans* 50 mg L⁻¹ (Vidal et al., 2006); robalo flecha *Centropomus undecimalis* 40 mg L⁻¹ (Souza-Junior e Alves-Junior, 2006).

Após 600 segundos de exposição ao anestésico, as Concentrações Letais (CL) estimadas foram: CL01 25,21 mg L⁻¹; CL50 45,13 mg L⁻¹ e CL99 65,05 mg L⁻¹. Na concentração de 25 mg L⁻¹, mesmo após 600 segundos de exposição ao anestésico, alguns peixes não atingiram a anestesia profunda. Tal fato foi constatado pela resposta a estímulos externos. A Figura 3 apresenta a mortalidade estimada de juvenis de piavuçu expostos a diferentes concentrações de eugenol durante 600 segundos.

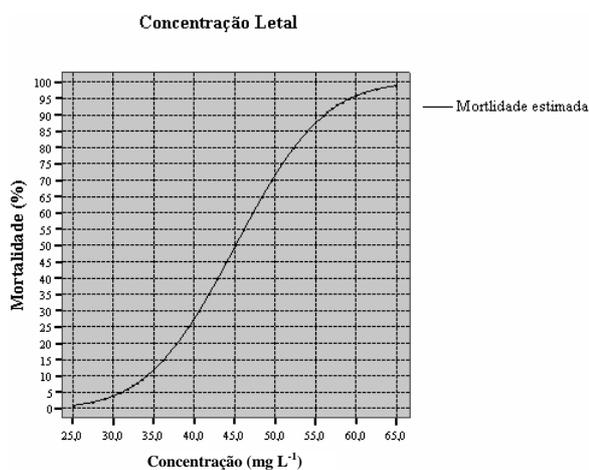


Figura 3. Mortalidade estimada de juvenis de piavuçu em diferentes concentrações de eugenol.

A exposição dos juvenis de piavuçu à concentração de 37,5 mg L⁻¹ de eugenol, em diferentes intervalos de tempo, determinou os seguintes Tempos de Concentrações Letais (TCL): TCL01 322,8 segundos; TCL50 854,9 segundos; e TCL99 1386,9 segundos. A Figura 4 apresenta a mortalidade estimada de juvenis de piavuçu expostos a 37,5 mg L⁻¹ de eugenol em diferentes intervalos de tempo.

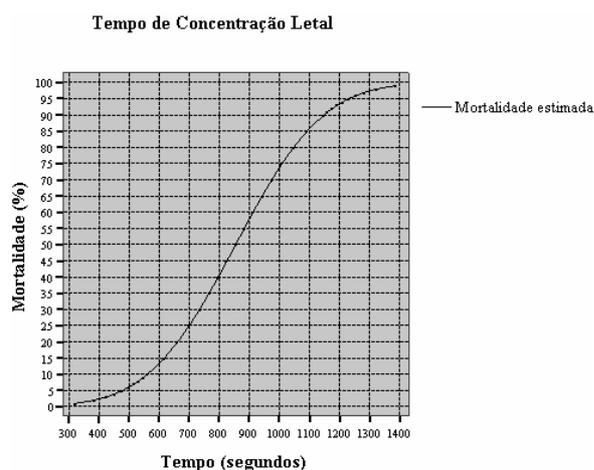


Figura 4. Mortalidade estimada de juvenis de piavuçu expostos ao eugenol em diferentes intervalos de tempo.

Os valores de Concentração Letal aos 600 segundos foram mais baixos que os encontrados para carpa comum CL01 51,6 mg L⁻¹, CL50 74,3 mg L⁻¹ e CL99 110,1 mg L⁻¹ (Valisek *et al.*, 2005a), e truta arco-íris CL01 63,9 mg L⁻¹, CL50 81,1 mg L⁻¹, CL99 100,1 mg L⁻¹ (Valisek *et al.*, 2005b); esses experimentos foram realizados a 19,9 e 14°C, respectivamente. Taylor e Roberts (1999), ao submeterem exemplares de truta arco-íris a 50 mg L⁻¹ de eugenol, determinaram que o TCL50 variou entre 20 e 30 minutos.

A diferença entre as Concentrações Letais (CL) citadas podem ser reflexo do fator espécie (Roubach e Gomes, 2001) ou mesmo da temperatura em que foram realizados os ensaios (Hoskonen e Pirhonen, 2004). Woosley *et al.* (2004) relataram que larvas de truta arco-íris expostas ao eugenol, durante 24 horas, apresentam valores de mortalidade mais altos em temperaturas mais elevadas. A variação da temperatura corporal afeta a velocidade das reações químicas: seu aumento eleva a energia cinética dos átomos e moléculas, facilitando as reações (Baldisserotto, 2002).

De acordo com Schmidt-Nilsen (2002), a temperatura corporal dos peixes é igual àquela do meio ambiente em que vivem, cujo aumento eleva a taxa metabólica dos animais e, por conseqüência, o consumo de oxigênio. Ainda, segundo esse autor, os peixes podem compensar a elevada demanda por oxigênio com maior número e/ou amplitude dos movimentos respiratórios, possibilitando que mais água passe pelas brânquias, assim como as substâncias nela dissolvidas.

Todas concentrações de eugenol alteraram o comportamento dos peixes e foram capazes de conduzi-los ao parâmetro comportamental definido para a indução anestésica. Observou-se redução do

tempo necessário para indução e aumento do tempo de recuperação à medida que a concentração foi elevada. Para o procedimento de manejo realizado durante o experimento, as melhores concentrações seriam 37,5 e 50 mg L⁻¹, por apresentarem tempos de indução e recuperação satisfatórios.

A concentração de 37,5 mg L⁻¹ se mostrou promissora, pela indução rápida (65 segundos) e recuperação (122,3 segundos), além da grande margem de segurança, já que o TCL01 (322,8 segundos) é aproximadamente cinco vezes maior que àquela necessário à indução. Mesmo sem a garantia de anestesia profunda em todos os peixes, para um período prolongado de exposição (600 segundos) deve-se utilizar 25 mg L⁻¹, pois nessas condições os testes realizados não estimam a ocorrência de mortalidade (<CL01). Em temperaturas superiores a 25°C as concentrações devem ser reduzidas; reações como redução dos movimentos operculares e resposta a estímulos externos devem ser levadas em consideração.

Segundo Valisek *et al.* (2005a), o eugenol possui baixo índice terapêutico, relação entre a concentração tóxica média e a concentração terapêutica que, de acordo com Svobodova e Vykusova (1991) citados por Valisek *et al.* (2005a) deve ser 4:1 ou maior. Uma comparação entre a CL50 (45,13 mg L⁻¹) e a concentração indicada para 600 segundos de anestesia (25 mg L⁻¹) sugere que o índice terapêutico do eugenol para indução de juvenis de piavuçu é 1,8:1.

Conclusão

O eugenol se mostrou eficiente como substância anestésica para juvenis de piavuçu. A concentração de 37,5 mg L⁻¹ é capaz de induzir a anestesia profunda em cerca de um minuto. A CL50 estimada (45,13 mg L⁻¹) é baixa em relação à concentração terapêutica da substância, porém o TCL01 (322,8 segundos) possibilita boa margem de segurança ao anestésico.

Referências

- BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia dos peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: UFSM, 2002.
- COLLINS, V.J. *Princípios de anestesiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
- COYLE, S.D. *et al.* *Anesthetics in aquaculture*. Disponível em: <www.aces.edu/dept/fisheries/aquaculture/documents/5864154-3900fs.pdf>. Acesso em: 28 out. 2005.
- CUNHA, M.A. *et al.* Níveis de cortisol em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao óleo de cravo (*Eugenol*) e extrato de *Condalia Buxifolia*. In: AQUACIENCIA 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Sociedade

- Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2006. CD-ROM.
- GRUSH, J. et al. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, New Rochele, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2004.
- HIKASA, Y. et al. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, Tokyo, v. 48, p. 341-351, 1986.
- HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. *J. Fish Biol.*, London, v. 64, p. 1136-1142, 2004.
- 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. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.
- KEENE, J.L. et al. The efficacy of clove oil as an anesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.*, Oxford, v. 29, p. 89-101, 1998.
- LAPEMM—Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica. Histoquímica do cravo. Disponível em: <<http://www.lapennm.ufba.br/cravo.htm>>. Acesso em: 28 out. 2005.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v. 26, n. 2, p.231-238, 2003.
- McGEE, M.; CICHRA, C. *Fish handling and transport*. Gainesville: University of Florida, 2002.
- MYLONAS, C.C. et al. 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*, Amsterdam, v. 246, p. 467-481, 2005.
- ONO, A.E.; KUBITZA, F. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3. ed. Jundiaí: Ed. do Autor, 2003.
- ROSS L.G.; ROSS B. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.*, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 37-41, 2001.
- SCHMIDT-NILSEN, K. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. São Paulo: Editora Santos, 2002.
- SOUZA-JUNIOR, V.B.; ALVES-JUNIOR, T.T. A eficácia do óleo de cravo (eugenol) como anestésico no manejo de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, mantidos em cativeiro. In: AQUACIENCIA 2006, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2006. CD-ROM.
- SPSS Incorporation—Statistical Package for the Social Sciences. *SPSS for Windows: statistical package for the social sciences: release 13.0*. Chicago: SPSS, 2004.
- TATAJE, D.R.; ZANIBONI FILHO, E. Cultivo do gênero *Leporinus*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. cap. 4, p. 81-104.
- TAYLOR, P.W.; ROBERTS, S.D. Clove oil: An Alternative anaesthetic for aquaculture. *North Am. J. Aquacult.*, Bethesda, v. 61, p. 150-155, 1999.
- VALISEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Med. Czech.*, Praha, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005a.
- VALISEK, J. et al. Effects of clove oil on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. BRNO*, Brno, v. 74, p. 139-146, 2005b.
- VIDAL, L.V.O. et al. Utilização do Eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). *Acta Sci. Biol. Sci.*, Maringá, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.
- WATERSTRAT, P.R. induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *J. World Aquacult. Soc.*, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 250-255, 1999.
- WOOSLEY, J. et al. Effect of temperature on clove oil anesthesia in Steelhead fry. *North Am. J. Aquacult.*, Bethesda, v. 66, p. 35-41, 2004.

Received on May 04, 2007.

Accepted on August 21, 2007.