

Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos

Luis Antonio Kioshi Aoki INOUE¹, Cheila Lima BOIJINK², Patrizia Teixeira RIBEIRO³, Ana Maria Dias da SILVA⁴, Elisabeth Gusmao AFFONSO⁵

RESUMO

O tambaqui é a principal espécie de peixe cultivado na Amazônia Ocidental. Porém durante o processo produtivo, práticas de manejo são necessárias para o monitoramento do crescimento e estado geral da sanidade dos animais. Para isso os animais devem ser anestesiados para maior segurança no trabalho. O eugenol, componente majoritário do óleo de cravo, tem sido bastante utilizado como anestésico alternativo para peixes por ser um produto natural e de baixo custo. Entretanto, estudos tratando de respostas metabólicas em peixes tropicais expostos a diferentes anestésicos são ainda necessários. Dentro desse intuito, o presente trabalho avaliou respostas metabólicas, detectadas por meio de alterações de parâmetros sanguíneos e plasmáticos do tambaqui, exposto ao eugenol em banhos anestésicos simulados. Respostas típicas ao estresse foram detectadas devido ao manuseio imposto aos peixes durante a realização dos banhos anestésicos. O eugenol não reduziu totalmente essas reações ao estresse. Por outro lado, esse anestésico não provocou estresse adicional em exposições curtas de 15 min em concentrações próximas a 20 mg L⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: *Colossoma macropomum*, respostas fisiológicas, hematologia.

Evaluation of tambaqui metabolic responses to eugenol in anesthetic baths

ABSTRACT

Tambaqui is the main farmed fish in the Western Amazon. However, in handling this fish has to be anesthetized for safety purposes, usually when evaluating growth and health conditions. Eugenol, the main component of clove oil, has been reported as an alternative fish anesthetic, because it is an inexpensive natural product. However, continued studies are necessary about the metabolic responses of tropical fish to anesthetics. The present work evaluated metabolic responses of tambaqui to eugenol in simulated anesthetic baths, measuring blood and plasma parameters. Typical metabolic stress responses to handling were detected, but they were not totally reduced by eugenol. On the other hand, the anesthetic dissolved in water did not provoke any extra charge of stress during short-term exposures in concentrations of about 20mg L⁻¹ for 15 min.

KEYWORDS: *Colossoma macropomum*, physiological responses, hematology.

¹ Embrapa. luis.inoue@cpaa.embrapa.br

² Embrapa. cheila.boijink@cpaa.embrapa.br

³ Centro Universitario Nilton Lins. patrizia_teixeira@hotmail.com

⁴ Inpa. anadias17@hotmail.com

⁵ Inpa. pgusmao@inpa.gov.br

INTRODUÇÃO

O tambaqui é a principal espécie de peixe cultivado na Amazônia Ocidental, devido a sua importância regional e demanda crescente nos mercados nortistas do Brasil. É uma espécie onívora relativamente bem adaptada às condições de cativeiro, aceitando rações artificiais e completas com índices desejáveis de crescimento e conversão alimentar. Ainda alcança preços atrativos nos exigentes mercados das grandes cidades amazônicas como Manaus, principal pólo consumidor dessa espécie (Araújo-Lima e Gomes 2005). Entretanto, durante o processo produtivo em cativeiro, práticas de manejo são necessárias para o monitoramento do crescimento e estado geral da sanidade dos animais. Para isso os peixes devem ser anestesiados para a maior segurança dos operadores, pois movimentação excessiva dos animais durante o manejo, envolvendo uso de agulhas como na coleta de sangue ou equipamentos eletrônicos como balança, pode representar riscos de acidentes, e ainda os próprios animais podem sofrer ferimentos na superfície do corpo por abrasão, queda e choques em superfícies duras e ásperas, sendo portas para parasitos oportunistas que podem levar a morte de animais (Honczaryk e Inoue 2009).

O eugenol é o componente majoritário do óleo de cravo da Índia e vários outros óleos essenciais extraídos de plantas da Amazônia. O eugenol tem sido recomendado como um anestésico alternativo para peixes por ser um produto natural e aparentemente com poucos riscos de intoxicação. Em adição, seu vasto uso na odontologia, baixo custo, características anti-sépticas e eliminação relativamente rápida do organismo estimulam ainda mais seu uso em peixes (Cho e Heath 2000; Woody *et al.* 2002; Kildea *et al.* 2004). Roubach *et al.* (2005) indicam o eugenol como um anestésico seguro para o tambaqui, sendo observadas ainda por Miranda *et al.* (2009) características positivas em banhos para o controle de parasitas de brânquias dessa espécie. Porém mais estudos a respeito do uso do eugenol em tambaqui são necessários, pois, dependendo do tempo de exposição ao anestésico e a concentração utilizada, o próprio anestésico pode ser prejudicial aos peixes causando até a morte de animais (Iwama e Ackerman 1994). O presente trabalho teve por objetivo avaliar respostas metabólicas do tambaqui ao eugenol, por meio do estudo de alterações de parâmetros sanguíneos e plasmáticos, em banhos anestésicos simulados, indicando vantagens e limitações do seu uso para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Tambaquis jovens com peso de $407,9 \pm 182,3$ g e comprimento de $28,3 \pm 4,2$ cm foram estocados por um mês em 12 gaiolas de 1 m^3 , numa densidade de 12 peixes por gaiola, montadas em um açude de 4 ha, numa propriedade particular nas imediações de Manaus, AM. Parâmetros da qualidade da

água foram monitorados duas vezes por semana no início do período da manhã (temperatura $29,0 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,14, oxigênio $6,6 \text{ mg L}^{-1}$, dureza $8,3 \text{ mg L}^{-1}$, alcalinidade $12,7 \text{ mg L}^{-1}$, amônia $0,03 \text{ mg L}^{-1}$). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 30% de proteína bruta durante dois meses até a saciedade aparente. Vinte e quatro horas antes do início do experimento a alimentação foi suspensa.

As 12 gaiolas foram numeradas e sorteadas para constituir quatro tratamentos com três repetições cada: Cont., T1, T2 e T3. Peixes do grupo Cont. foram somente amostrados. O procedimento experimental adotado nos grupos T1, T2 e T3 foram similares. Os peixes do grupo T1 foram transferidos respectivamente das três gaiolas de estocagem inicial para três caixas de isopor, acomodadas em uma canoa que podia chegar ao lado de cada gaiola, com 20 L de água cada, sem a adição de qualquer produto. Esses peixes aí permaneceram por 15 min em banho simulado, e após esse período foram respectivamente retornados as gaiolas iniciais. Os peixes dos grupos T2 e T3 sofreram o mesmo manejo adotado em T1, exceto pelo fato de que as caixas de isopor continham respectivamente 20 mg L^{-1} e 60 mg L^{-1} de eugenol na água, previamente diluído em etanol (1:20). Amostragens de peixes foram realizadas em dois momentos distintos: 0 h e 24 h após os procedimentos experimentais descritos. Em cada amostragem, três peixes foram coletados por gaiola para biometria e coleta de sangue por punção caudal, utilizando-se seringas previamente heparinizadas, após o que o animal era descartado do grupo de peixes utilizados no trabalho. Os animais remanescentes nas gaiolas permaneceram nas mesmas condições iniciais para observação de sobrevivência por mais um mês, sendo ao final desse período retirados, contados e descartados.

Foram feitas determinações sanguíneas de hematócrito (Goldenfarb *et al.* 1971), hemoglobina (Drabkin 1948) e contagem do número de células vermelhas (Lima *et al.* 1969). A partir desses valores sanguíneos foram calculados (Lima *et al.* 1969): volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Aliquotas de sangue foram centrifugadas a 14400 g por 3 min para separação de plasma, utilizada para determinações de glicose (Trinder 1969), amônia (Gentzkow e Masen 1942) e lactato (Harrower e Brown 1972).

Os dados foram submetidos à análise de variância ("Anova two-way"). E quando o valor de F indicava significância ($P < 0,05$), foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias 0h após os procedimentos experimentais e recuperação de 24h.

RESULTADOS

Não foi observada mortalidade de peixes durante todo o presente trabalho. Os valores sanguíneos de hematócrito apresentaram aumento significativo somente em T3, 0 h após os estímulos experimentais. Vinte e quatro horas depois os valores de hematócrito em T3 apresentaram-se semelhantes aos observados no grupo Cont. Os valores de hemoglobina, número de células vermelhas (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferenças significativas em resposta aos tratamentos utilizados (Tabela 1).

Os valores de glicose e amônia do plasma apresentaram elevações em resposta ao manuseio imposto aos peixes em T2. Com relação ao eugenol, o tambaqui apresentou resposta glicêmica e da amônia plasmática de maneira adicional, ou seja, devido ao anestésico, no tratamento T3 0h após estímulos. Os valores de lactato não mostraram aumento em relação aos estímulos experimentais e sim devido ao eugenol em ambos os tratamentos, T2 e T3. Vinte e quatro horas depois da imposição dos estímulos experimentais, os valores plasmáticos de glicose, amônia e lactato apresentaram-se semelhantes entre todos os tratamentos: Cont., T1, T2 e T3 (Figura 1).

DISCUSSÕES

Práticas de manejo podem ser agentes estressores agudos da piscicultura, pois rompem o equilíbrio dos animais com o ambiente (homeostase), iniciando o estresse, que é o conjunto das reações metabólicas em resposta a um ou mais estímulos adversos do ambiente ou imposto pelo produtor rural com fins de operacionalização dos sistemas de produção. O estresse, quando em intensidade e duração excessiva, pode resultar em conseqüências indesejáveis no cultivo como a manifestação de

doenças em toda a população e também na morte de animais (Iwama *et al.* 2004).

O efeito de anestésicos como redutores de estresse em peixes durante o manejo algumas vezes é contraditório, pois reações aos próprios anestésicos têm também sido observadas em peixes expostos a triclaína metano sulfonato (MS 222), óleo de cravo, metomidato, benzocaína, gás carbônico e fenoxietanol (Ivervsen *et al.* 2003; Pirhonen e Schreck 2003; Wagner *et al.* 2003; Tort *et al.* 2002). Os procedimentos experimentais aplicados neste trabalho tiveram o objetivo de simular as condições em que anestésicos são utilizados no campo. Dessa forma, a transferência dos peixes das gaiolas de estocagem inicial respectivamente para as caixas de isopor com volume reduzido de água e as respectivas voltas às gaiolas foram estímulos adversos suficientes para iniciar as respostas metabólicas ao estresse, que ficou evidente observando-se os aumentos da glicose, amônia e lactato do plasma. Esses aumentos são interpretados de forma que tão logo o cérebro detecte um ou mais estímulos adversos, dois eixos metabólicos 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 que o animal fuja ou se adapte às novas condições (Iwama *et al.* 2004). As respostas plasmáticas observadas neste trabalho não puderam ser reduzidas pelo eugenol. Por outro lado, os resultados observados em T2 mostram que o anestésico testado não provocou resposta metabólica extra nesse tratamento. Em T3, no entanto, observou-se resposta metabólica aumentada devido ao eugenol. Ou seja, concentrações do anestésico testado acima de 60 mg L⁻¹ num tempo de exposição de 15 min são mais estressantes ao tambaqui que a ausência de qualquer produto, tal como observado em T1 versus T3.

Tabela 1 - Respostas sanguíneas do tambaqui ao eugenol utilizado em banhos anestésicos. Cont. peixes somente amostrados nas gaiolas de estocagem. T1 peixes respectivamente transferidos das gaiolas para caixas de isopor com 20 L de água sem a adição de anestésico por 15 min; após foram retornados as gaiolas. T2 e T3 sofreram o mesmo manejo aplicado em T1, porém as caixas continham respectivamente eugenol em concentrações de 20 e 60 mg L⁻¹.

Tratamento	Amostragem de peixes 0 h após estímulos experimentais					
	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	RBC milhões/ μ l	VCM fL	HCM (pg/cel)	CHCM (g/dL)
Cont.	26,5 \pm 0,9a	10,1 \pm 0,6	3,9 \pm 0,1	68,4 \pm 2,2	26,3 \pm 2,2	38,9 \pm 3,5
T1	29,2 \pm 1,7a	9,3 \pm 0,5	4,1 \pm 0,1	72,0 \pm 4,2	22,9 \pm 1,2	32,1 \pm 1,0
T2	30,6 \pm 0,9a	9,7 \pm 0,7	3,9 \pm 0,1	78,0 \pm 3,1	24,7 \pm 1,8	31,6 \pm 2,0
T3	33,6 \pm 1,2b	11,0 \pm 0,4	3,9 \pm 0,1	85,2 \pm 2,7	27,9 \pm 1,2	33,0 \pm 1,8
Tratamento	Amostragem de peixes 24 h após estímulos experimentais					
	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	RBC milhões/ μ l	VCM fL	HCM (pg/cel)	CHCM (g/dL)
Cont.	26,8 \pm 1,1a	10,0 \pm 0,4	3,2 \pm 0,1	84,3 \pm 5,3	31,2 \pm 1,5	37,6 \pm 1,8
T1	27,2 \pm 1,1a	10,3 \pm 0,4	3,4 \pm 0,1	82,4 \pm 5,1	31,4 \pm 2,1	38,1 \pm 1,1
T2	24,7 \pm 1,9a	11,1 \pm 0,8	3,4 \pm 0,1	72,8 \pm 5,8	32,7 \pm 2,3	46,8 \pm 4,3
T3	24,0 \pm 0,9a	10,5 \pm 0,7	3,4 \pm 0,1	72,3 \pm 2,8	31,5 \pm 2,1	43,8 \pm 2,9

Valores expressos como média mais ou menos erro padrão da média.

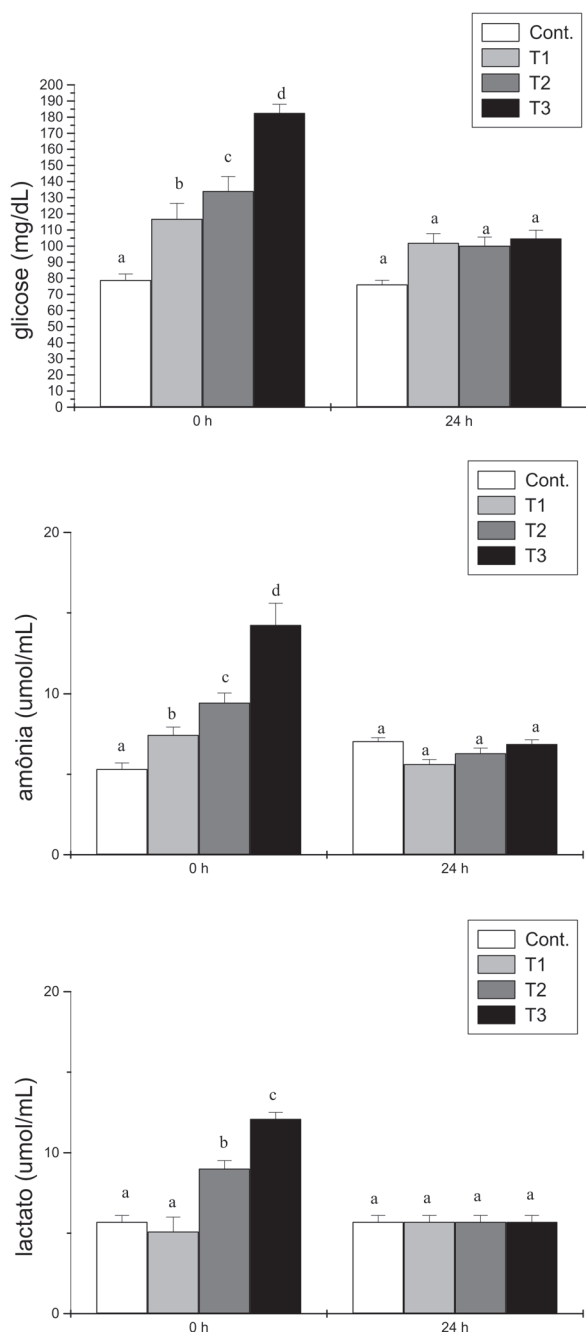


Figura 1 - Respostas plasmáticas do tambaqui ao eugenol utilizado em banhos anestésicos. Cont. peixes somente amostrados nas gaiolas de estocagem, T1 peixes respectivamente transferidos das gaiolas para caixas de isopor com 20 L de água sem a adição de anestésico por 15min; após foram retornados as gaiolas de origem. T2 e T3 sofreram o mesmo manejo aplicado em T1, porém as caixas continham respectivamente eugenol em concentrações de 20 e 60 mg L⁻¹. Amostragens de animais foram feitas 0h e 24 h após estímulos experimentais descritos.

Hiperglicemia plasmática em peixes é uma ferramenta importante para os estudos de estresse em condições de campo (Hattingsh 1976). Assim, os aumentos da glicose em relação ao grupo Controle, não submetido ao estresse, é um indicador seguro de resposta metabólica aumentada neste trabalho, mediada pelo cortisol, sendo ainda esse fato extensivamente abordado na literatura (Mommsen *et al.* 1999; Iwama *et al.* 2004). Entretanto, a análise do cortisol plasmático em peixes nas condições brasileiras é muitas vezes economicamente pouco viável. Roubach *et al.* (2001) detectaram aumento adicional de glicemia em matrinxã, quando submetido a banho anestésico com MS 222 em concentrações acima de 150 mg L⁻¹ por 10 min. Em outro estudo, a benzocaína proporcionou redução da hiperglicemia plasmática em matrinxã durante banhos anestésicos em concentrações de até 60 mg L⁻¹ por 10 min (Inoue *et al.* 2004). Deriggi *et al.* (2006) e Barbosa *et al.* (2007) encontraram alguns efeitos redutores de estresse do eugenol em tilápia e matrinxã, respectivamente, em concentrações de 80 mg L⁻¹ e 60mg L⁻¹ por 10 min. Roubach *et al.* (2005) não observaram diminuição de estresse em juvenis de tambaqui pelo eugenol em concentrações de até 135 mg L⁻¹ por 10 min. Porém nesses três trabalhos com eugenol, estresse adicional, exclusivamente devido ao anestésico, não foi observado.

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 fato pode ter contribuído para o aumento da amônia plasmática em T3, 0 h após estímulos experimentais. Peixes em banhos anestésicos sofrem alterações dos batimentos cardíacos e operculares. Assim, as taxas de passagem de água e sangue pelas brânquias ficam alteradas, podendo dificultar a excreção de compostos nitrogenados como o observado em T3, 0 h após estímulos. De igual maneira, o equilíbrio da quantidade de água no sangue pode ter sido alterado em resposta aos estímulos adversos aplicados nesse trabalho, induzindo maior hidratação das hemácias como observado nos valores mais elevados de hematócrito em T3, 0 h após estímulos experimentais. O número de hemácias (RBC) e os demais parâmetros sanguíneos (hemoglobina, VCM, HCM e CHCM) permaneceram constantes durante todo o experimento, reforçando a idéia da maior hidratação do sangue, aumentando o volume das células e consequentemente os maiores valores de hematócrito observados em T3 (Mc Donald e Milligan 1997).

As reações metabólicas anaeróbicas e seu principal produto ficaram evidenciados, quando observado os aumentos do lactato plasmático em T2 e T3, 0 h após os procedimentos experimentais (Hochachka 1980). Inoue *et al.* (2004) observaram em matrinxã diminuição das concentrações de

lactato durante o manejo, quando utilizaram a benzocaína e o fenoxietanol em banhos de até 60 mg L⁻¹ e 600 mg L⁻¹, respectivamente, por 10 min. Entretanto, o eugenol proporcionou aumento do lactato em tambaqui, possivelmente devido alguma deficiência respiratória provocada pelo uso deste anestésico, já que em T1 não foi observado aumento do lactato plasmático. Ou ainda, o tempo de exposição ao eugenol utilizado nesse trabalho pode ter sido maior ao que o tambaqui pode tolerar em dificuldade respiratória induzida por um anestésico. Tempos de exposição inferiores a 15 min provavelmente devem ser utilizados.

O eugenol apresentou-se um anestésico satisfatório para o tambaqui, embora não tenham sido observados efeitos metabólicos claros como redutor de estresse nas condições proporcionadas. Mortalidade de peixes não foi observada mesmo um mês após a imposição dos estímulos experimentais. O eugenol proporciona segurança aos trabalhadores para a realização de práticas de manejo do tambaqui possivelmente com mínimo estresse em concentrações próximas a 20 mg L⁻¹ e tempo de exposição de no máximo 15 min. Estresse adicional ao banho anestésico com eugenol não foi observado nessa concentração e tempo de exposição.

AGRADECIMENTOS

CNPQ (471263-2007-9) e Embrapa (MP 03.08.01.05.70.002).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Araújo-Lima, C.; Gomes, L. 2005. Tambaqui *Colossoma macropomum*, p. 175-202. In: Gomes, L.C.; Baldiserotto, B. (Eds). *Natives species to fish farming in Brazil*. Vol. 1. Editora UFSM, Santa Maria, RS (in portuguese).
- Barbosa, L.M.; Moraes, G.; Inoue, L.A.K.A. 2007. Metabolic responses of matrinxã to eugenol in anesthetic baths. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 29: 255-260 (in Portuguese, with abstract in English).
- Cho, G.K.; Heath, D.D. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31: 537-546.
- Drabkin, D. 1948. The standardization of hemoglobin measurement. *American Journal of Medical Science*, 215: 110-111.
- Deriggi, G.; Inoue, L.A.K.A.; Moraes, G. 2006. Stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 28: 269-274.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56: 35-39.
- Gentzkow, C.J.; Masen, J.M. 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *Journal of Biological Chemistry*, 143: 531-544.
- Harrower, J.R.; Brown, C.H. Blood lactic acid. 1972. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. *Journal of Applied Physiology*, 32: 224-228.
- Hattingh, J. 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. *Journal of Fish Biology*, 10: 191-195.
- Hochachka, P.W. 1980. *Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance*. Harvard University Press, Cambridge. 181 pp.
- Honzaryk, A.; Inoue, L.A.K.A. 2009. Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills. *Ciência Rural*, 39: 577-579 (in Portuguese, with abstract in English).
- Inoue, L.A.K.A.; Hackbarth, A.; Moraes, G. 2004. Assessment of 2-phenoxyethanol and benzocaine as anesthetics for field procedures in matrinxã (*Brycon cephalus*). *Biodiversidade Pampaena*, 2: 10-15 (in Portuguese, with abstract in English).
- Iversen, M.; Finstad, B.; Mckinley, D.; Eliassen, R. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, aquí-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221: 549-566.
- Iwama, G.; Ackerman, A. 1994. Anaesthetics, p. 1-15. In: Hochachka, P.; Mommsen, T. (Eds). *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 3. Elsevier Science, Amsterdam.
- Iwama, G.; Afonso, L.; Todgham, A.; Ackerman, P.; Nakano, K. 2004. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 204: 15-19.
- Kildea, J.; Allan, G.; Kearney, R. 2004. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and Aquí-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 232: 265-277.
- Lima, A.O.; Soares, J.B.; Greco, J.B.; Galizzi, J.; Cançado, J. 1969. *Laboratory methods Medical Clinics*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ª Edição. 653 pp. (in Portuguese).
- McDonald, G.; Milligan, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress, p. 119-144. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University press.
- Miranda, W.; Boijink, C.; Inoue, L.A.K.A. 2009. Assessment of anti parasites activity of eugenol in tambaqui (*Colossoma macropomum*) infectados com monogenóides. In: 61ª Reunião Anual da SBPC, 2009, Manaus, AM. **Anais...** Manaus: Universidade Federal do Amazonas (in Portuguese).
- Mommsen, T.; Vijayan, M.; Moon, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Review in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.
- Pirhonen, J.; Schreck, C.B. 2003. Effects of anesthesia with MS 222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220(1-4): 507-514.
- Roubach, R.; Gomes, L.C.; Storti-Filho, A.; Val, A. 2001. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. *Acta Amazonica*, 31(1): 159-163.

- Roubach, R.; Leao, F.A.; Gomes, L.C. 2005. Eugenol as an efficacious anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research*, 36: 1056-1061.
- Tort, L.; Puigcerver, M.; Crespo, S.; Padros, F. 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, 33: 907-910.
- Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Analytical Clinical Biochemistry*, 6: 24-27.
- Wagner, G. Woody, C.A.; Nelson. 2003. The ability of clove oil and MS222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 34: 1139-1146.
- Woody, C.A.; Nelson, J.; Ramstad, K. 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. *Journal of Fish Biology*, 60 (2): 340-347.

Recebido em 12/03/2010

Aceito em 11/08/2010