



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO



MAYARA FERNANDA CABRAL DA ROCHA SANTOS

**ANESTESIA COM EUGENOL EM *Hypancistrus seideli* (SILURIFORMES:
LORICARIIDAE): TESTE COM EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO**

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana da Silva Pereira

ALTAMIRA-PA

MARÇO-2025

MAYARA FERNANDA CABRAL DA ROCHA SANTOS

**ANESTESIA COM EUGENOL EM *Hypancistrus seideli* (SILURIFORMES:
LORICARIIDAE): TESTE COM EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO**

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana da Silva Pereira

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

ALTAMIRA-PA

MARÇO-2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237a Santos, Mayara Fernanda Cabral da Rocha.
Anestesia com eugenol em *Hypancistrus seideli* (Siluriformes:
Loricariidae): teste com exposição e reexposição / Mayara
Fernanda Cabral da Rocha Santos, . — 2025.
42 f.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Tatiana da Silva Pereira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Altamira, Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Conservação, Altamira, 2025.

1. Anestesia. 2. *Hypancistrus seideli*. 3. Eugenol. I. Título.

CDD 597.0929

MAYARA FERNANDA CABRAL DA ROCHA SANTOS

**ANESTESIA COM EUGENOL EM *Hypancistrus seideli* (SILURIFORMES:
LORICARIIDAE): TESTE COM EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Data da aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr. Flavio Manoel Rodrigues da Silva-Junior
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dra. Lílian Lund Amado
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dr. Luis André Luz Barbas
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA)

Dr. Marcelo Moraes Andrade
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC/UFMA)

DEDICATÓRIA

Á Deus pelo cuidado, amor e proteção nos momentos bons e difíceis nestes dois anos de mestrado.

Á todos os familiares e amigos que torceram pela minha formação acadêmica e dedicaram parte do seu tempo para orar, rezar, torcer por mim e por este trabalho.

Á cada professor que um dia foi responsável por minha formação acadêmica desde que esta jornada como estudante iniciou-se.

Á meu esposo Edson da Silva Santos que me incentivou fortemente a prosseguir na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação por possibilitar minha formação como pesquisadora.

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA), pela concessão da bolsa.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para a realização desta dissertação. Primeiramente, agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Tatiana da Silva Pereira, pelo direcionamento, amizade, paciência, a confiança e apoio inestimáveis ao longo deste processo. Sua expertise e insights foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. E os conselhos e ensinamentos vão para além do ambiente profissional. Agradeço também ao Prof. Dr. Leandro de Melo Sousa, pela confiança, pelas orientações, por nos ensinar a fazer o certo e aguçar a nossa curiosidade.

Ao Prof. Msc. Fabio José Torres de Barros pelos diálogos sobre pesquisa, estatística, pelo auxílio nos experimentos, pela disponibilidade em ajudar na construção deste trabalho. Suas valiosas sugestões e comentários, certamente enriqueceram esta pesquisa.

Minha gratidão aos colegas do nosso grupo de pesquisa ECOTOXINGU e do laboratório (LAQUAX): Milena Souza, Moebio Menezes, Thais Lopes, Waterson, Renan, Adriele, Maria Aparecida, Beatriz Marques, Rian, Tiago Campos, Jospin Soglohoun, Eris Amorin, Léo Rodrigues, Tuty, Wana Clara. Agradeço a ajuda no cuidado com os peixes e na realização dos experimentos. Agradeço a Maria Danyelle pela parceria ao longo desses dois anos morando em Altamira-PA.

Por fim, agradeço ao meu esposo Edson da Silva Santos pelo cuidado, apoio emocional, espiritual e financeiro prestado nos últimos dois anos. Obrigada pelas aventuras vividas no Xingu. Por ter vindo a Altamira tantas vezes e dar a mim a sensação de lar só por estar presente. Faltam palavras para dizer o quanto isso foi importante. Minha eterna gratidão.

Agradeço a Deus por ter me colocado neste lugar, pela oportunidade de ter vivido esta experiência maravilhosa da pós-graduação e por não ter deixado faltar nada.

“Eu fiz perguntas; eu queria saber o porquê.
Eles se acostumaram com as minhas
perguntas e com o fato de eu ser a única
mulher ali”.

Katherine Johnson

RESUMO GERAL

O presente trabalho busca determinar a concentração segura do anestésico eugenol para a anestesia de *Hypancistrus seideli*, peixe amazônico, endêmico do rio Xingu e de importância para o comércio ornamental, através de um protocolo alternativo que utiliza menos animais do que os testes tradicionais de LC50 e LD50. Foram analisados os efeitos anestésicos do eugenol em 64 espécimes de *H. seideli*. Para essa avaliação utilizamos os estágios já padronizados por Ross e Ross de 2008 adaptados para loricarídeos. Os peixes foram escolhidos randomicamente e colocados individualmente em aquários, com parâmetros controlados. Foram testados 64 espécimes de *H. Seideli* divididos em quatro grupos, onde o grupo um e dois receberam 2 mg.L⁻¹ da solução anestésica em tempos diferentes. O grupo um a cada um minuto e o grupo dois a cada dois minutos. Estes mesmos peixes foram reexpostos ao eugenol três meses depois para saber se houve tolerância reversa nos animais. O grupo três e quatro eram constituídos de peixes que nunca tiveram contato com eugenol. Eles receberam as concentrações referentes as médias das concentrações encontradas no grupo um e dois, respectivamente 32,6 mg.L⁻¹ e 24,87 mg.L⁻¹, mas sem a necessidade de reexposição após três meses. Na preparação da solução, o eugenol foi diluído em etanol 70%, na proporção 1:9. Os peixes foram escolhidos randomicamente e observados simultaneamente por dois pesquisadores. Cada peixe foi testado individualmente em aquários contendo 5 L de água. O teste PERMANOVA foi realizado mostrando que não houve diferença nas doses de exposição e reexposição e que a concentração de exposição segura de anestesia para *H. seideli* foi de 32,6 mg.L⁻¹ onde 100% dos peixes chegaram a anestesia e em tempo hábil. Não houve mortalidade durante o experimento, nem após meses da realização dos testes. O protocolo utilizado neste trabalho foi efetivo e seguro para o uso de eugenol em espécimes de *H. seideli*.

Palavras-chave: Acari-pão, Amazônia, *Syzygium aromaticum*, peixes ornamentais.

ABSTRACT

The present study seeks to determine the safe concentration of the anesthetic eugenol for the anesthesia of *Hypancistrus seideli*, an Amazonian fish endemic to the Xingu River and of importance to the ornamental trade, through an alternative protocol that uses fewer animals than traditional LC50 and LD50 tests. The anesthetic effects of eugenol were analyzed in 64 specimens of *H. seideli*. For this evaluation, we used the stages already standardized by Ross and Ross in 2008 adapted for loricariids. The fish were randomly chosen and placed individually in aquariums with controlled parameters. Sixty-four specimens of *H. seideli* were tested, divided into four groups, where groups one and two received 2 mg.L⁻¹ of the anesthetic solution at different times. Group one every minute and group two every two minutes. These same fish were re-exposed to eugenol three months later to determine if there was reverse tolerance in the animals. Groups three and four consisted of fish that had never had contact with eugenol. They received concentrations referring to the averages of the concentrations found in groups one and two, respectively 32.6 mg.L⁻¹ and 24.87 mg.L⁻¹, but without the need for re-exposure after three months. In the preparation of the solution, the eugenol was diluted in 70% ethanol, in a 1:9 ratio. The fish were randomly chosen and observed simultaneously by two researchers. Each fish was tested individually in aquariums containing 5 L of water. The PERMANOVA test was performed, showing that there was no difference in the exposure and re-exposure doses and that the safe anesthesia exposure concentration for *H. seideli* was 32.6 mg.L⁻¹, where 100% of the fish reached anesthesia in a timely manner. There was no mortality during the experiment, nor months after the tests were performed. The protocol used in this study was effective and safe for the use of eugenol in specimens of *H. seideli*.

Keywords: Acari-pão, Amazon, *Syzygium aromaticum*, ornamental fish

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 <i>Hypancistrus seideli</i> e o aquarismo da Amazônia.....	11
1.2 Uso de anestésicos em peixes	13
1.3 4-Alil-2-metoxifenol: Eugenol.....	14
2 OBJETIVO GERAL	16
3 REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I - Anestesia com eugenol em <i>Hypancistrus seideli</i> (Siluriformes: Loricariidae): teste com exposição e reexposição.	21
CONCLUSÃO GERAL	39

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Hypancistrus seideli* e o aquarismo da Amazônia

A coleta de peixes ornamentais, realizada por mergulho, é a principal atividade de subsistência de muitas comunidades ribeirinhas na Amazônia, permitindo a captura em locais profundos e de difícil acesso (ARAÚJO et al., 2017). Na região amazônica encontram-se 2.406 espécies de peixes (JÉZÉQUEL et al., 2020). Na região neotropical a família Loricariidae contém mais de 1.000 espécies ((FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023).

Os peixes da família Loricariidae atraem a atenção do mundo aquarista (RAMOS et al., 2015). Esse interesse também se reflete nos registros de comércio ilegal de peixes, onde a maioria das espécies traficadas pertencem a esta família (BELTRÃO et al., 2021; SOUSA et al., 2021).

Das famílias de peixes da Amazônia, a família Loricariidae, cujos representantes são chamados de peixes de couro, cascudos ou bodós, é uma das mais importantes e exportadas na Amazônia (LADISLAU et al., 2020). Apresentam características como boca em formato circular e posicionada ventralmente, com poder de sucção que lhes permite fixar-se aos substratos (ARMBRUSTER, 2004). Seu corpo possui placas dérmicas ossificadas formando uma espécie de armadura (REIS et al., 2003). São peixes de hábito bentônico e a maioria se alimenta de algas e detritos. Porém existem espécies que se alimentam de larvas e esponjas (ZUANON et al., 2015).

O *Hypancistrus seideli*, (Figura 1) também conhecido como acari-pão, *kinger tiger*, pleco, L-333, é endêmico do rio Xingu e tem importante relevância no mercado de peixes ornamentais sendo coletado majoritariamente por pescadores artesanais (REIS et al., 2020, SOUSA et al, 2025).

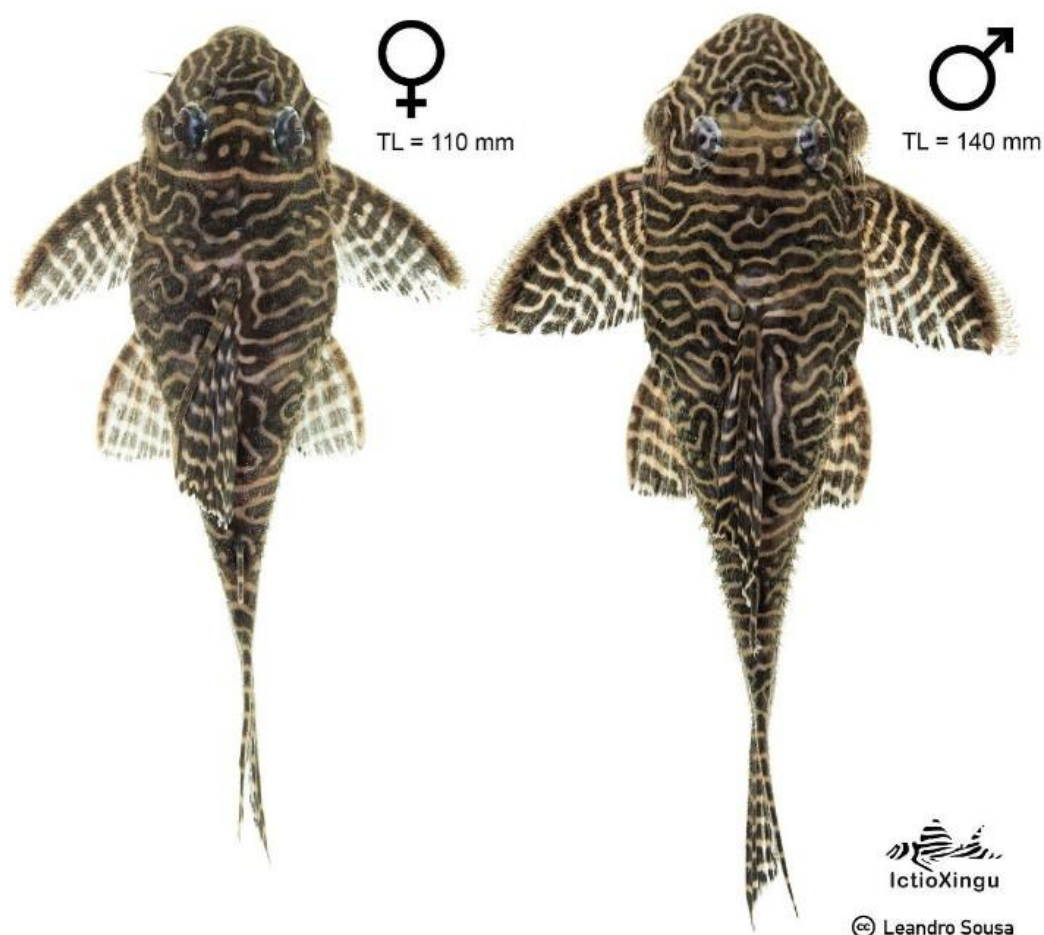


Figura 1: Exemplares macho e fêmea adultos de *Hypancistrus seideli*, vista dorsal.

Foto: Leandro Sousa

Esta espécie, que apresenta em média 50 g e tamanho médio de 10 cm, possui dimorfismo sexual conspícuo: os machos são caracterizados por ter maior quantidade de odontódeos, apresentados na região do focinho quando adultos, têm cabeça longa, larga e triangular, maior comprimento em tamanho, nas nadadeiras, na largura entre os olhos e papila genital em forma de V; as fêmeas possuem menos odontódeos, em formato cônico, cabeça mais arredondada e em formato de U, abdômen mais largo e a papila urogenital com formato de U (REIS et al., 2022, SOUSA et al, 2025).

Hypancistrus seideli é uma espécie importante no aquarismo e sua pesca é feita de forma artesanal, não existindo técnicas de manejo na forma de protocolos para todas as fases do desenvolvimento, sendo coletado majoritariamente por pescadores artesanais (REIS et al., 2021; SOUSA et al, 2025). É necessário a criação de pacotes tecnológicos para esta espécie com fins a obter espécies de ótima qualidade tanto para o aquarismo quanto para conservação (REIS et al., 2021).

1.2 Uso de anestésicos em peixes

A anestesia consiste na perda total ou parcial da sensibilidade, capacidade de responder a estímulos internos e externos e supressão do controle neuromotor voluntário, podendo ser usado para este fim substâncias sintéticas ou naturais (SUMMERFELT *et al.*, 1990). Este procedimento faz parte da rotina do transporte, procedimentos médicos e terapêuticos, criação, diagnose e é um dos pré-requisito para a eutanásia (POSNER, HARMS, SMITH; 2019).

Ao serem anestesiados, os peixes entram em estado de letargia resultante de um processo controlado que atenua a sensibilidade a estímulos externos (PURBOSARI *et al.*, 2019). Biólogos pesqueiros com frequência utilizam anestésicos para diminuir o estresse resultante do manejo de peixes (KE *et al.*, 2018) e, conseqüentemente, reduzir a taxa de mortalidade (RUCINQUE *et al.*, 2017).

Os anestésicos podem ser classificados em agentes derivados de plantas (também chamados naturais) e agentes não derivados de plantas (ou sintéticos) (HOSEINI; TAHERI MIRGHAED; YOUSEFI, 2019); (PURBOSARI *et al.*, 2019). Devido a menor toxicidade e alto potencial de biodegradação existe bastante interesse na promoção do uso de anestésicos naturais pela indústria de peixes ornamentais (ROMANELI *et al.*, 2018); (VENTURA *et al.*, 2020). Por exemplo, é bastante comum, o uso de óleos essenciais de plantas como *Myrcia sylvatica* (SACCOL *et al.*, 2018), *Aloysia triphylla* (ZEPPENFELD *et al.*, 2014), *Lippia alba* (KAMPKE *et al.*, 2018), *Curcuma longa* (SACCOL *et al.*, 2018), que além da anestesia, trazem outros benefícios como a atenuação do estresse oxidativo e fisiológico (HOSEINI; TAHERI MIRGHAED; YOUSEFI, 2019).

No entanto, os autores dos trabalhos acima citados relatam que os óleos essenciais apresentam a desvantagem de serem constituídos de vários outros componentes, em concentrações diferentes, em que nem todos são anestésicos. Por exemplo, o óleo essencial de *Mentha piperita*, de onde se extrai o mentol, é formado de 26 compostos (YADEGARINIA *et al.*, 2006).

Padronizar um protocolo anestésico ideal que inclua concentração, método de administração, tempo de indução e recuperação para todas as espécies de peixes é uma tarefa difícil (LEE *et al.*, 2015). As condições para a escolha de um bom anestésico, além das

fisiológicas, devem incluir facilidade de administração e acesso, baixo risco à exposição humana, baixo custo, menor impacto ao ambiente (POSNER, HARMS, SMITH; 2019), segurança para o peixe, apresentar toxicidade zero ou mínima (ROSS; ROSS, 2008), preservar a dinâmica circulatória e causar o mínimo ou nenhum efeito colateral (ALHO DA COSTA et al., 2022).

Para obtenção de bons resultados é crucial escolher o anestésico correto e aplicá-lo na concentração eficaz (ROMANELI et al., 2018). Por isso, a pesquisa por fármacos alternativos para a imobilização deve ser sempre realizada (DE ARAÚJO et al., 2023).

A liberação de hormônios do estresse (corticosteróides e catecolaminas), também ocorre no processo de anestesia. Com isso, quanto mais rápida for a imobilização, menos desses hormônios entrarão na corrente sanguínea (ROTHWELL et al., 2005); (ROMANELI et al., 2018). Assim como ocorre com aves, répteis e mamíferos, deve ser realizada com o mínimo de desconforto para o animal, mantendo os padrões fisiológicos os mais próximos possíveis do normal (POSNER, HARMS, SMITH; 2019).

A perda de animais resultante do transporte ineficiente é um outro estímulo para a pesquisa de novas tecnologias de transporte mais seguros (PURBOSARI et al., 2019). As principais pesquisas nessa temática buscam testar e descobrir as concentrações ideais de diferentes anestésicos para cada espécie, estágios da anestesia, em diferentes estágios de vida, tempo de cada estágio e possíveis efeitos colaterais desses fármacos (AYDIN; BARBAS, 2020).

1.2 4-Alil-2-metoxifenol: Eugenol

O eugenol, alil-2-metoxifenol, é um dos componentes ativos do óleo de cravo e tornou-se um anestésico bastante utilizado em peixes (BOLASINA; DE AZEVEDO; PETRY, 2017). Este composto é extraído das folhas, caule e flores da planta cravo *Syzygium aromaticum* (YOUSEFI et al., 2018) e apresenta baixo custo, bom desempenho e fácil excreção (ARÉCHIGA-PALOMERA et al., 2023). Tem sido apontado também como um excelente antibacteriano para peixes (PATHIRANA et al., 2019) e é o mais utilizado em uma ampla variedade de organismos aquáticos (PURBOSARI et al., 2019).

Assim como no mentol, o eugenol atua nos receptores GABA A, bloqueando os receptores, ou modulando estes receptores via sinalização celular (LEE et al., 2015). Esse anestésico age modificando a permeabilidade da membrana celular, o que é imprescindível na condução de estímulos nervosos (BOWKER; TRUSHENSKI; BOWMAN, 2019).

Diferentes monoterpenos induzem à anestesia profunda em diferentes espécies (FÉLIX et al., 2023). Comparando a eficácia de benzocaina, MS-222 e eugenol como agentes anestésicos em *Poecilia vivípara*, notou-se que foi significativamente maior o tempo de sedação leve com o uso do eugenol para esta espécie (BOLASINA; DE AZEVEDO; PETRY, 2017).

Em *Cyprinus carpio* o tempo de recuperação teve correlação linear, ao serem usados mentol e eugenol (MAZANDARANI; HOSEINI, 2017). Eugenol foi mais eficaz na anestesia de carpa comum, comparado a mentol e 1,8-cineol (MAZANDARANI; HOSEINI, 2017).

A concentração segura para a anestesia de *Prochilodus nigricans*, permitiu tempo ideal de indução e recuperação, não causando lesões nas brânquias e não aumentou significativamente os níveis de glicose no sangue (VIEGAS et al., 2020).

Em *Pterophyllum scalare*, o tempo de recuperação foi independente das doses de óleo de cravo (MITJANA et al., 2014). Já em juvenis de *Mugil liza*, o tempo de recuperação foi diminuído com o aumento das concentrações de eugenol (BRAZ et al., 2017). Já o eugenol ministrado em *Pangasius hypothalmus* resultou que a concentração e peso dos peixes influenciaram significativamente na indução e recuperação anestésica (HOSEINI; RAJABIESTERABADI; TARKHANI, 2015).

O uso do eugenol é controverso. Mudança comportamental e excitabilidade neuronal similar a convulsão foram alguns dos efeitos observados em juvenis de *Colossoma macropomum*, ao serem expostos em banhos anestésicos de curta duração (BARBAS et al., 2021).

Ao serem comparados os níveis de mRNA do GlucoR no sangue e nas brânquias, de peixes expostos a eugenol e mentol, o eugenol, ativou mais a síntese do mRNA (ZAPATA-GUERRA et al., 2020). O estudo de Zapata-Guerra et al., (2020) sugere que peixes anestesiados com eugenol, podem estimular mais respostas ao estresse por glicocorticoides comparado a anestesia com mentol. É provável que a maior quantidade de gene GlucoR, nos peixes anestesiados seja resultante de maior nível de cortisol no grupo tratado com eugenol (ZAPATA-GUERRA et al., 2020). A genotoxicidade do eugenol e de outros anestésicos, ainda precisa ser testada em diversas espécies de peixes (NASCIMENTO et al., 2020).

Em algumas espécies, recuperações lentas resultantes da anestesia com eugenol podem estar relacionadas a característica oleosa do anestésico, que fica aderido as brânquias (BRAZ et al., 2017). O fato do eugenol não ser solúvel em água e a dificuldade em limpar os materiais que entram em contato com a solução são fatores desvantajosos (BOLASINA; DE

AZEVEDO; PETRY, 2017). Barbas et al. (2021) relataram que o eugenol pode não ser o fármaco mais adequado para indução anestésica de curto prazo, pois levanta questões importantes relacionadas a qualidade de vida dos peixes.

No entanto, tanto o óleo de cravo quanto o eugenol foram mais eficazes quando comparados a anestésicos sintéticos, demonstrando tempo de indução e recuperação mais rápidos (PURBOSARI et al., 2019). Os resultados de Félix et al. (2023) apresentaram a existência de correlação negativa significativa entre o tempo de indução, recuperação e as temperaturas de banhos anestésicos (FÉLIX et al., 2023).

Comparando-se eugenol, benzocaina e óleo de *Lippi alba*, aplicados as espécies de *Oreochromis niloticus* e *Apocorophium lacustris*, benzocaina e *L. alba*, precisaram de mais três minutos para chegar à anestesia (NASCIMENTO et al., 2020). Contrapondo também o óleo de cravo e eugenol com os anestésicos fitoterápicos mais comuns, concluiu-se que todos os outros foram menos eficientes na anestesia de peixes (HOSEINI; TAHERI MIRGHAED; YOUSEFI, 2019).

2. OBJETIVO GERAL

Propor um protocolo da concentração de exposição ideal de eugenol e tempos de anestesia e recuperação seguros para a anestesia de *Hypancistrus seideli*.

2.1Objetivos específicos

- . Comparar tempo e concentrações anestésicas de exposição e reexposição de *Hypancistrus seideli* em diferentes tratamentos;
- . Verificar se há diferença nas respostas de indução e recuperação de *Hypancistrus seideli* entre machos e fêmeas;
- . Verificar dentre os fatores sexo, tempo de indução, fator *k* e concentração, quais fatores mais influenciam na resposta anestésica de *Hypancistrus seideli*.

3. REFERÊNCIAS

- ALHO DA COSTA, B. M. P. et al. Integrated behavioural, neurological, muscular and cardiorespiratory response in tambaqui, *Colossoma macropomum* anaesthetized with menthol. **Aquaculture**, v. 560, p. 738553, nov. 2022.
- ARAÚJO, J. G. D. et al. Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 297–307, 15 jun. 2017.
- ARÉCHIGA-PALOMERA, M.A. et al. Putting the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae) to sleep: effects of clove oil and lidocaine anesthetic. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1-6, 2023.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 1, p. 1–80, maio 2004.
- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v. 520, p. 734999, abr. 2020.
- BARBAS, L. A. L. et al. Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105734, fev. 2021.
- BELTRÃO, H. et al. Trafficking of ornamental fish in te Brazilian Amazon. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, 26 nov. 2021.
- BOLASINA, S. N.; DE AZEVEDO, A.; PETRY, A. C. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 56–60, maio 2017.
- BOWKER, J. D.; TRUSHENSKI, J. T.; BOWMAN, M. Efficacy of Eugenol to Lightly Sedate Freshwater Salmonids for an Extended Time Period. **North American Journal of Aquaculture**, v. 81, n. 1, p. 40–46, jan. 2019.
- BRAZ, R. D. S. et al. Benzocaína, MS-222, eugenol e mentol como anestésicos para juvenis de tainha *Mugil liza*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 605–613, 15 dez. 2017.
- DE ARAÚJO, E. R. L. et al. Electroencephalographic Response in Juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum*, Exposed to Short-Term Anaesthetic Baths with Geraniol and Citronellol. **Biology**, v. 12, n. 1, p. 90, 6 jan. 2023.
- FÉLIX, L. et al. A meta-analytic review of monoterpene for fish anaesthesia. **Fish and Fisheries**, v. 24, n. 3, p. 367–380, maio 2023.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W., N.; VAN DER LAAN, R. CATÁLOGO DE PEIXES DE ESCHMEYER: GÊNEROS, ESPÉCIES, REFERÊNCIAS. , 2023. Disponível em: <

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).>. Acesso em: 6 dez. 2023

GRESSLER, L. T. et al. Behavioral and histological features of zebrafish following sedation with eugenol or propofol. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 244, p. 105482, nov. 2021.

HOSEINI, S. M.; RAJABIESTERABADI, H.; TARKHANI, R. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 2, p. 405–412, fev. 2015.

HOSEINI, S. M.; TAHERI MIRGHAED, A.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 550–564, ago. 2019.

JÉZÉQUEL, C. et al. A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 96, 19 mar. 2020.

KAMPKE, E. H. et al. Genotoxic effect of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 163–171, abr. 2018.

KE, C. et al. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets. **Aquaculture**, v. 484, p. 338–342, fev. 2018.

LADISLAU, D. S. et al. Ornamental fishing in the region of Barcelos, Amazonas: socioeconomic description and scenario of activity in the view of “piabeiros”. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 3, p. 544–556, set. 2020.

LEE, S. H. et al. Eugenol Inhibits the GABAA Current in Trigeminal Ganglion Neurons. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0117316, 30 jan. 2015.

MAZANDARANI, M.; HOSEINI, S. M. Menthol and 1,8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3041–3051, jun. 2017.

MITJANA, O. et al. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, v. 433, p. 491–495, set. 2014.

NASCIMENTO, H. D. S. et al. Genotoxicity evaluation of three anesthetics commonly employed in aquaculture using *Oreochromis niloticus* and *Astyanax lacustris*. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100357, jul. 2020.

PATHIRANA, H. N. K. S. et al. Antibacterial activity of clove essential oil and eugenol against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Slovenian veterinary research**, v. 56, n. 1, 29 mar. 2019.

POSNER, P. P.; HARMS, C. A.; SMITH, S. A. Sedation, Anesthesia, Analgesia and Euthanasia. In: SMITH, S. A. **Fish diseases and medicine**. Florida: Imprensa CRC press,

2019. p.283-304

PURBOSARI, N. et al. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. **Aquaculture and Fisheries**, v. 4, n. 4, p. 129–133, jul. 2019.

RAMOS, FM. et al. Ornamental fish of economic and biological importance to the Xingu River. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3 suppl 1, p. 95–98, ago. 2015.

REIS, R. G. A. et al. Evidence of secondary sexual dimorphism in King Tiger Plecos *Hypancistrus* sp, Loricariidae, of the Amazon River basin. **Aquaculture Research**, v. 53, n. 10, p. 3718–3725, jul. 2022.

REIS, R. G. A. et al. Feed management and stocking density for larviculture of the Amazon ornamental fish L333 king tiger pleco *Hypancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae). **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1995–2003, maio 2021.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; CARL, J.; FERRARIS, J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. 1st ed., 2003.

ROMANELI, R. D. S. et al. Efficacy of Benzocaine, Eugenol, and Menthol as Anesthetics for Freshwater Angelfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 30, n. 3, p. 210–216, set. 2018.

ROSS, L. G.; ROSS, B. (EDS.). **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. 1. ed. Wiley, 2008.

ROTHWELL, S. E. et al. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 140, n. 3, p. 289–298, mar. 2005.

RUCINQUE, D. S. et al. Anesthetic use of eugenol and benzocaine in juveniles of red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 30, n. 1, p. 60–66, jan. 2017.

SACCOL, E. M. H. et al. *Myrcia sylvatica* essential oil in the diet of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) attenuates the stress response induced by high stocking density. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 1381–1392, out. 2018.

SOUSA, L. M. D. et al. Two new species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Xingu, Amazon, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 23, n. 1, p. e240080, 2025.

SUMMERFELT RC, SMITH L, SCHRECK C, MOYLE P. Anesthesia, surgery and related techniques: **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, v. 8, n. 2, 1990.

VENTURA, A. S. et al. Natural anesthetics in the transport of Nile tilapia: Hematological and biochemical responses and residual concentration in the fillet. **Aquaculture**, v. 526, p. 735365, set. 2020.

VIEGAS, R. M. et al. Eugenol as an efficient anesthetic for neotropical fish *Prochilodus nigricans* (Teleostei, Prochilodontidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1813–1820, set. 2020.

YADEGARINIA, D. et al. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita L.* and *Myrtus communis L.* essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1249–1255, jun. 2006.

YOUSEFI, M. et al. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. **Aquaculture**, v. 495, p. 376–383, out. 2018.

ZAPATA-GUERRA, N. A. et al. Menthol as anaesthetic for red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*) and its effect on *HIF1a* and *Glucor* gene expression. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 11, p. 4421–4429, nov. 2020.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 101–107, jan. 2014.

ZUANON, J. et al. **Guia de peixes da Reserva Adolpho Ducke**. [s.l.] Editora INPA, 2015.

Este capítulo está formatado nas normas da revista Aquaculture, o qual será submetido.
<https://www.sciencedirect.com/journal/aquaculture/publish/guide-for-authors>

Capítulo 1: Manuscrito

ANESTESIA COM EUGENOL EM *Hypancistrus seideli* (SILURIFORMES: LORICARIIDAE): TESTE COM EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO

Anestesia com eugenol em *Hypancistrus seideli* (Siluriformes: Loricariidae): teste com exposição e reexposição

Mayara Fernanda Cabral da Rocha Santos ^{a, b*}, Fábio José Torres de Barros ^{b, c}, Tatiana da Silva Pereira ^{a, b} E-mail: mayara.santos@altamira.ufpa.br*

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Pará, Campus Altamira, Altamira, PA, CEP 68372-040, Brasil.

^b Laboratório de Aquicultura de Peixes Ornamentais do rio Xingu (LAQUAX). Universidade Federal do Pará, Campus Altamira, Altamira, PA, CEP 68372-040, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, CEP 66077-830, Brasil.

RESUMO: A sedação e a anestesia são importantes para reduzir o estresse durante o manejo de peixes. Com essa preocupação, este trabalho buscou propor um protocolo para encontrar a concentração para anestesia com eugenol em *Hypancistrus seideli*, um peixe amazônico de importância comercial e ecológica. Foram testados 64 espécimes de *H. Seideli* divididos em quatro grupos, onde o grupo um e dois receberam 2 mg.L⁻¹ da solução anestésica em tempos diferentes. O grupo um a cada um minuto e o grupo dois a cada dois minutos. Estes mesmos peixes foram reexpostos ao eugenol três meses depois para saber se houve tolerância reversa nos animais. O grupo três e quatro eram constituídos de peixes que nunca tiveram contato com eugenol. Eles receberam as concentrações referentes as médias das concentrações encontradas no grupo um e dois, respectivamente 32,6 mg.L⁻¹ e 24,87 mg.L⁻¹, mas sem a necessidade de reexposição após três meses. Na preparação da solução, o eugenol foi diluído em etanol 70%, na proporção 1:9. Os peixes foram escolhidos randomicamente e observados simultaneamente por dois pesquisadores. Cada peixe foi testado individualmente em aquários contendo 5 L de água. O teste PERMANOVA foi realizado mostrando que não houve diferença nas doses de exposição e reexposição e que a concentração de exposição segura de anestesia para *H. seideli* foi de 32,6 mg.L⁻¹ onde 100% dos peixes chegaram a anestesia e em tempo hábil. Não houve mortalidade durante o experimento, nem após meses da realização dos testes. O protocolo utilizado neste trabalho foi efetivo e seguro para o uso de eugenol em espécimes de *H. seideli*.

Palavras-chave: Acari-pão, Amazônia, *Syzygium aromaticum*, Rio Xingu, peixes ornamentais

ABSTRACT: Sedation and anesthesia are important for reducing stress during fish handling. With this concern in mind, this study aimed to propose a protocol to determine the effective concentration for anesthesia using eugenol in *Hypancistrus seideli*, an Amazonian fish of commercial and ecological importance. A total of 64 *H. seideli* specimens were tested, divided into four groups. Groups one and two received 2 mg·L⁻¹ of the anesthetic solution at different time intervals: group one every minute and group two every two minutes. The same fish were re-exposed to eugenol three months later to assess whether reversible tolerance had developed in the animals. Groups three and four received concentrations corresponding to the average concentrations found in groups one and two, respectively 32.6 mg·L⁻¹ and 24.87 mg·L⁻¹. For the solution preparation, eugenol was diluted in 70% ethanol at a 1:9 ratio. The fish were randomly selected and observed simultaneously by two researchers. Each fish was tested individually in aquariums containing 5 L of water. The PERMANOVA test was

performed, showing that there was no difference between exposure and re-exposure doses, and that the safe exposure concentration of anesthesia for *H. seideli* was $32.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, where 100% of the fish reached anesthesia within a suitable time frame. The protocol used in this study proved effective and safe for the use of eugenol in *H. zebra* specimens.

Key-words: Acari-pão, Amazon, *Syzygium aromaticum*, Xingu, ornamental fish

1. Introdução

Hypancistrus seideli (Sousa, Sousa, Oliveira, Sabaj Pérez, Zuanon & Rapp Py-Daniel; 2025) é uma espécie de peixe da família Loricariidae e ordem dos Siluriformes, que são as duas segundas maiores categorias taxonômicas de peixes da Amazônia (Dagosta and Pinna, 2019). Conhecido como acari-pão ou *kinger tiger*, esta espécie é de grande relevância no mercado de peixes e coletado majoritariamente pelos pescadores artesanais (REIS et al., 2020; RAMOS et al., 2015). Entre os códigos na aquariofilia pode ser nomeado como L-333 e L-66 (Araújo et al., 2017).

A espécie é endêmica, ocorre na natureza entre o canal baixo do Rio Xingu, a jusante do trecho conhecido como Volta Grande do Xingu até o encontro com o rio Amazonas, ocupando diferentes correntezas, sedimentos e profundidades que variam de de 1 a 40 m ou mais de acordo com pescadores locais (Sousa et al., 2025). Apesar de ser uma espécie importante para a aquariofilia, não existem protocolos para manejo desta espécie, inclusive com anestésicos (Reis et al., 2021).

A anestesia é essencial para procedimentos de manejo e transporte, minimizando o estresse e permitindo a coleta de dados importantes, entre esses o fator de condição (k), um índice fundamental que revela informações valiosas sobre o estado nutricional e fisiológico dos indivíduos, refletindo a relação entre peso e comprimento dos peixes (De Oliveira et al., 2019; Mitjana et al., 2018). Segundo Oliveira et al. (2020), ele também serve como indicador da saúde das populações.

A determinação de novas concentrações de sedativos e anestésicos para peixes é desafiadora, influenciada por fatores como temperatura da água, estresse agudo, fator k , peso corporal, tamanho do animal (Barros et al., 2023; Sneddon, 2012; Mitjana et al., 2014, 2014; Vercellini et al., 2024; Zahl et al., 2012). O sexo é um aspecto que influencia na resposta anestésica pois as diferenças entre machos e fêmeas de peixes não se restringe à aparência, estendendo-se à fisiologia e genética (Šimková et al., 2015; Sneddon, 2012). Todas estas diferenças podem ser observadas intraespecífica e interespecífica (Zahl et al., 2012).

O tipo de anestésico também contribui para a resposta de anestesia dos peixes (Braz et al., 2017; Romaneli et al., 2018). Dentre os anestésicos disponíveis no mercado, o eugenol, um dos componentes ativos do óleo de cravo, tornou-se um anestésico bastante utilizado em peixes (Bolasina et al., 2017). Tem sido apontado também como um excelente antibacteriano para peixes (Pathirana et al., 2019) e é o mais utilizado em uma ampla variedade de organismos aquáticos (Purbosari et al., 2019), sendo mais comum o uso em peixes (He et al., 2020; Ribeiro et al., 2019; Vercellini et al., 2024; Viegas et al., 2020).

Nascimento et al. (2025) observaram que *Baryancistrus xanthellus*, peixe importante no aquarismo e endêmico do rio Xingu, desenvolveu tolerância reversa ao eugenol. Ao serem expostos ao anestésico e reexpostos dois meses depois, os peixes mostraram maior sensibilidade, atingindo a anestesia mais rapidamente com concentrações menores de eugenol no segundo bioensaio (Nascimento et al., 2025).

Diante disso, sabendo o quanto *H. seideli* é importante para o mercado aquarista e para os pescadores locais e da não existência de protocolos de manejo para esta espécie (Reis et al., 2021), o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo seguro de anestesia com eugenol para *Hypancistrus seideli*, determinando a dose ideal, os tempos de indução e recuperação, além de avaliar a possibilidade de tolerância reversa após reexposição ao anestésico.

2. Metodologia

2.1 Pré-ensaio

Utilizamos 64 espécimes de *Hypancistrus seideli*, que compõem o plantel do Laboratório de Aquicultura de Peixes Ornamentais do Xingu (LAQUAX), Universidade Federal do Pará, Campus de Altamira.

O protocolo de manejo dos peixes consistiu em alimentação diária, com ração comercial (SUPRA®) e sifonação diária para garantir a qualidade da água. Os peixes foram mantidos em aquários de 80 litros montados em sistema de recirculação e parâmetros da água controlados. O pH foi mantido próximo de 7, e a temperatura a 30° C (parâmetros naturais do rio Xingu).

Os procedimentos adotados para este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (UFPA) nº 09274280923.

2.2 Ensaios

A solução anestésica foi elaborada diluindo o eugenol em etanol 70%, na proporção 1:9 e concentração de 30 mg.L⁻¹ (Caldas et al., 2021). Para o procedimento experimental, os peixes foram deixados em jejum de 24 horas, sendo escolhidos randomicamente e observados simultaneamente por dois pesquisadores.

Os 64 espécimes foram agrupados em quatro grupos, cada um contendo 8 machos e 8 fêmeas. O primeiro grupo foi submetido a um tratamento de indução anestésica com a adição de 2 mg.L⁻¹ de eugenol a cada 1 minuto, até alcançar o estágio desejado de anestesia. O segundo grupo recebeu a mesma concentração (2 mg.L⁻¹), porém adicionada a cada 2 minutos. Os grupos três e quatro foram expostos às concentrações anestésicas médias obtidas a partir das dosagens dos dois tratamentos anteriores.

Para todos os tratamentos, o experimento foi realizado em aquário contendo 5 L de água e aeração constante. O comportamento dos animais foram observados frente às concentrações anestésicas. Para a observação, utilizamos os estágios de anestesia e recuperação sugeridos por Ross e Ross (2008) para Characiformes, com adaptações para loricarídeos (Nascimento et al., 2025):

- Estágio I: o peixe não foge diante do toque físico;
- Estágio II: perda da sucção oral;
- Estágio III: não consegue voltar a posição de barriga para baixo;
- Estágio IV: imóvel, apenas respirando.

Como os loricarídeos são animais de hábitos bentônicos, vivendo junto ao substrato, foi utilizada uma pinça para avaliar se havia perda de equilíbrio dos espécimes a cada 20 segundos. Após atingido o estágio IV, foi realizada a biometria dos peixes e iniciado o processo de recuperação.

A recuperação foi realizada em outro aquário contendo 5 L com água e oxigenação contínua. Os estágios de recuperação (Nascimento et. al, 2025) foram observados considerando:

- Estágio I: início da movimentação;
- Estágio II: virar com o abdômen para baixo (comportamento natural dos loricarídeos);
- Estágio III: retorno da sucção oral;
- Estágio IV: nada normalmente.

Para testar os estágios de recuperação, também foi utilizada uma pinça para verificar o

animal a cada 10 segundos. Foi cronometrado tempo para alcançar cada estágio da indução, bem como da recuperação.

Em todos os tratamentos, foram utilizados peixes que nunca haviam tido contato com eugenol. Contudo, apenas as exposições de 1 e 2 minutos foram repetidas após três meses, com os mesmos animais, a fim de investigar a ocorrência de tolerância reversa. Os tratamentos 3 e 4 tiveram como objetivo identificar qual das duas exposições (1 ou 2 minutos) seria a mais eficaz para determinar a concentração ideal para anestésias *H. Seideli* e conseqüentemente encontrar esta concentração.

Para avaliar as duas concentrações descobertas pelo tratamento 1 e 2, o procedimento adotado consistiu em testar um espécime por vez. Estes foram colocados em um aquário contendo 5 L de água e aeração constante. Cada concentração foi adicionada ao aquário e cronometrado o tempo necessário para que o animal alcançasse ao estágio IV. Depois de atingido esse estágio foi realizada a biometria do peixe e iniciado o processo de recuperação em outro aquário contendo 5 L com água e oxigenação.

Na fase de recuperação, o animal era colocado no aquário de barriga para cima, e cronometrado o tempo em que atingia o estágio IV. Ao recuperar, o peixe era levado para um aquário separado onde ficava sob observação por 24 horas.

Todos os espécimes testados passaram por observações diárias pós ensaios, quanto a avaliação de possível mudança comportamental e até mortalidade.

2.3 Análise estatística

Para análise estatística, inicialmente realizamos o cálculo da relação peso-comprimento dos animais para calcular o fator de condição (k). Para isso, foram verificados os pressupostos da regressão linear simples, os parâmetros (intercepto e coeficiente angular) das regressões da relação peso comprimento e comprimento-comprimento foram estimados a partir dos dados logaritimizados. O fator k ideal foi calculado pela razão entre o peso observado e o peso estimado, sendo este último obtido das equações de regressão.

Para verificar se houve diferença na exposição e reexposição, foi realizada uma PERMANOVA em que a variável dependente foi a concentração de exposição e as variáveis independentes foram sexo, tempo e k .

Para saber quais os fatores mais influenciaram na anestesia foi realizada um teste de PERMANOVA, onde a variável dependente foi a concentração de exposição e as variáveis

independentes foram sexo, fator k e tempo.

Para verificar se houve diferença entre machos e fêmeas o teste PERMANOVA foi realizado tendo como variável independente sexo e variável dependente foi a concentração de exposição.

As análises estatísticas foram conduzidas no RStudio, utilizando o R versão 4.3.0. O nível de significância foi avaliado por meio de 999 permutações aleatórias, com um valor alfa de 5% e intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

*3.1 Primeira indução anestésica de *Hypancistrus seideli**

3.1.1 Tratamento de 2 mg.L⁻¹/1min (Grupo 1)

As variáveis Sexo (Pr (>F) = 0,031968), concentração de exposição (Pr (>F) = 0,000999) e tempo (Pr (>F) = 0,035964), contribuíram na variabilidade dos dados no tratamento de indução de 2 mg.L⁻¹/1 min. A concentração de exposição (R² = 0,98850), foi o fator de maior influência nos dados respondendo a 98,85%. A resposta de significância do sexo, indica que peixes de sexos diferentes tendem a se comportar de forma diferente quanto as dosagens.

3.1.2 Tratamento de 2 mg.⁻¹L/2min-Grupo 2

O resultado da análise PERMANOVA mostrou que as variáveis que influenciaram neste tratamento foram sexo (Pr (>F) = 0,005994), concentração de exposição (Pr (>F) = 0,000999) e tempo (Pr (>F) = 0,014985), sendo que a concentração de exposição foi a variável de maior destaque, explicando 97,8% da variância nos dados.

3.2 Segunda indução anestésica: reexposição ao anestésico após 3 meses

3.2.1 Tratamento de 2 mg⁻¹L/1min (Grupo 1)

A análise mostrou que a concentração de exposição (Pr (>F) = 0,000999) é o fator mais importante na diferença dos dados, explicando 96,68% da variabilidade observada. O tempo (Pr (>F) = 0,001998) também exerce influência significativa, mas com menor impacto (3,11%). Porém, a variável sexo não apresentou influência significativa a um nível de confiança de 95%.

3.2.2 Tratamento de 2 mg⁻¹L/2min (Grupo 2)

O resultado das reexposições dos *H. seideli*, após três meses para o tratamento de 2

mg.L⁻¹/2min, mostrou que a concentração de exposição (Pr (>F) = 0,000999) explica a maior parte da variância (98,578%), o que reforça sua importância. Sexo (Pr (>F) = 0,001998), tempo (Pr (>F) = 0,002997) e fator *k* (Pr (>F) = 0,013986), também foram significativos.

Quanto as interações, vemos que sexo associado ao *k* (Pr(>F) = 0,025974) e tempo associado ao *k* (Pr (>F) = 0,040959) também foram variáveis significativas. Isso aponta que o efeito tanto do tempo como do sexo, depende do *k*.

3.3 Dosagem única

3.3.1 Concentração de 24,87 mg.L⁻¹

Quando aplicada a concentração de 24,87 mg.L⁻¹, foi observado que apenas o efeito combinado do sexo, tempo e estágio (Pr (>F) = 0,000999) causou diferença na dissimilaridade dos dados. Isso implica dizer que, o modo como uma destas variáveis afeta um resultado está ligada aos valores ou intensidades dos outros dois fatores.

Nesta concentração de exposição, nem todos os peixes atingiram o estágio IV da anestesia. Apenas 50% dos peixes conseguiram chegar ao estágio IV.

3.3.2 Concentração de 32,6 mg.L⁻¹

Neste teste, sexo associado ao fator *k* foi significativo (Pr (>F) = 0,000999). Ou seja, com 32,6 mg.L⁻¹, o *k* é uma variável importante na concentração de exposição anestésica de machos e fêmeas de *H. seidelii*, influenciando na forma como os diferentes sexos respondem aos anestésicos.

3.4 Comparação dos tratamentos de indução anestésica

No tratamento de 2 mg.L⁻¹/1min, para indução anestésica, fêmeas (36,75 ± 7,85 mg. L⁻¹) e machos (36,5 ± 8,47 mg. L⁻¹) reexpostos ao eugenol, precisaram de maior concentração de exposição para alcançar a anestesia. Para este estágio, as dosagens de exposição e reexposição por sexo, variaram de 32,25 ± 9,76 a 36,75 ± 7,85 mg.L⁻¹.

Já no tratamento de exposição e reexposição de 2 mg.L⁻¹/2min, as médias das concentrações para o estágio IV, variaram de 22 ± 5,66 a 29 ± 3,54 mg.L⁻¹ entre machos e fêmeas (Figura 1). As fêmeas da reexposição, receberam maior concentração de exposição (29 ± 3,54 mg.L⁻¹). Mas essa variação na concentração de exposição não foi significativa.

Quando comparado exposição e reexposição dos tratamentos de $2\text{mg.L}^{-1}/1\text{min}$ (Fig1a), temos que cada estágio obteve dosagens iguais. Para $2\text{mg.L}^{-1}/2\text{min}$ (Fig1b), apenas as dosagens do estágio IV de $2\text{mg.L}^{-1}/2\text{min}$ não foram iguais entre todos os sexos e tipos de exposição. Neste estágio as dosagens iguais ocorreram para machos expostos e reexpostos, fêmeas expostas e reexpostas e entre machos e fêmeas expostos. Ou seja, machos e fêmeas da reexposição apresentaram dosagens diferentes no estágio IV.

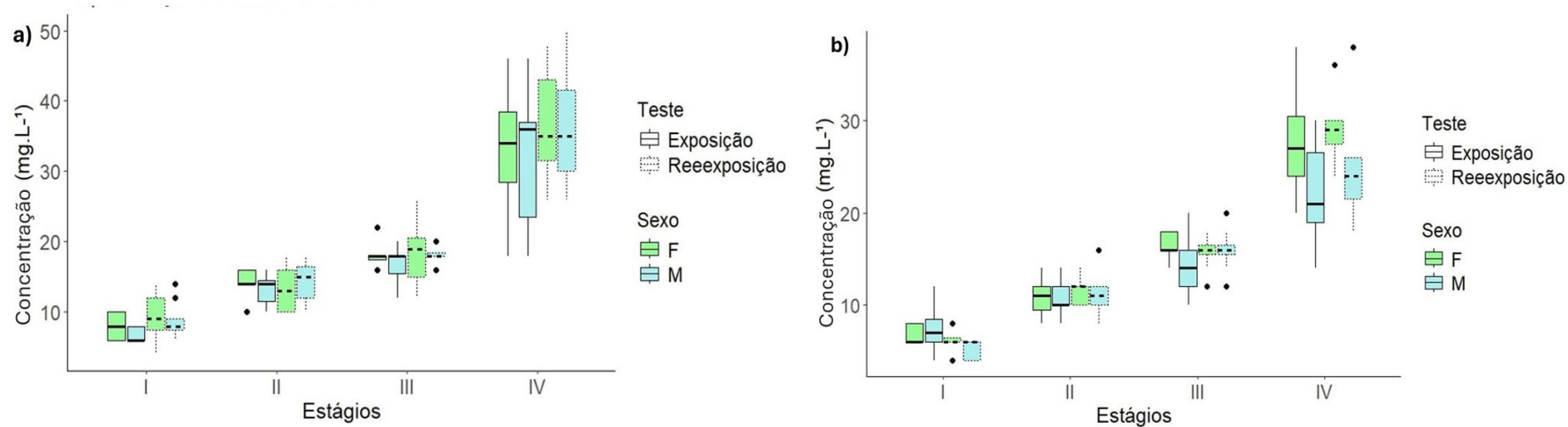


Figura 1. Induções anestésicas das exposições e reexposições ao eugenol em *Hypancistrus seideli* sob diferentes estágios: a) tratamento de 2mg.L⁻¹/1min e b) tratamento de 2mg.L⁻¹/2min.

Na Tabela 1 são apresentadas as médias dos tempos para a indução anestésica dos estágios I a IV para machos e fêmeas, do tratamento de exposição única. As concentrações apresentadas são as médias das concentrações resultantes dos tratamentos de exposição de 2 mg.L⁻¹/1min (32,6 mg.L⁻¹) e 2 mg.L⁻¹/2min (24,87 mg.L⁻¹).

Tabela 1. Média de tempo das concentrações de eugenol encontradas usando o tratamento de exposição de 2 mg.L⁻¹/1min (32,6 mg.L⁻¹) e 2 mg.L⁻¹/2min (24,87 mg.L⁻¹) para todos os estágios de *H. seideli*.

Indução anestésica-Dosagem Única					
Sexo	*Tempo do Estágio I	*Tempo do Estágio II	*Tempo do Estágio III	*Tempo do Estágio IV	Concentração (mg.L ⁻¹)
Machos	1:15 ± 00:29	1:56 ± 00:39	2:44 ± 01:34	5:38 ± 01:59	24,87
Fêmeas	1:06 ± 00:19	1:31 ± 00:14	2:34 ± 02:35	5:35 ± 00:31	24,87
Machos	00:54 ± 00:12	1:15 ± 00:14	1:22 ± 00:13	2:46 ± 01:13	32,6
Fêmeas	00:53 ± 00:16	1:14 ± 00:16	1:25 ± 00:17	3:27 ± 01:47	32,6

* O tempo está apresentado em minutos. Os dados estão representados em média ± desvio padrão

Na concentração de 24,87 mg.L⁻¹, ao analisarmos o tempo de anestesia para o estágio IV (Fig. 2), temos que a mediana para ambos os sexos é igual. Ou seja, o tempo médio de anestesia não difere entre machos e fêmeas nesta concentração também houve diferença na variação dos tempos de anestesia entre machos e fêmeas. Machos apresentaram maior variação no tempo de anestesia quando comparado as fêmeas.

O tempo médio de anestesia, também não diferiu entre machos e fêmeas que receberam 32,6 mg.L⁻¹ de solução anestésica. Quando comparadas as dosagens, os *H. seideli* que receberam 32,6 mg.L⁻¹ de solução, chegaram mais rápido ao estágio IV da indução anestésica. Nas duas concentrações, fêmeas levaram mais tempo para iniciar o estágio IV comparado aos machos. Porém, quando comparado entre fêmeas que receberam concentrações diferentes, a variabilidade no tempo foi maior naquelas que receberam 32,6 mg.L⁻¹.

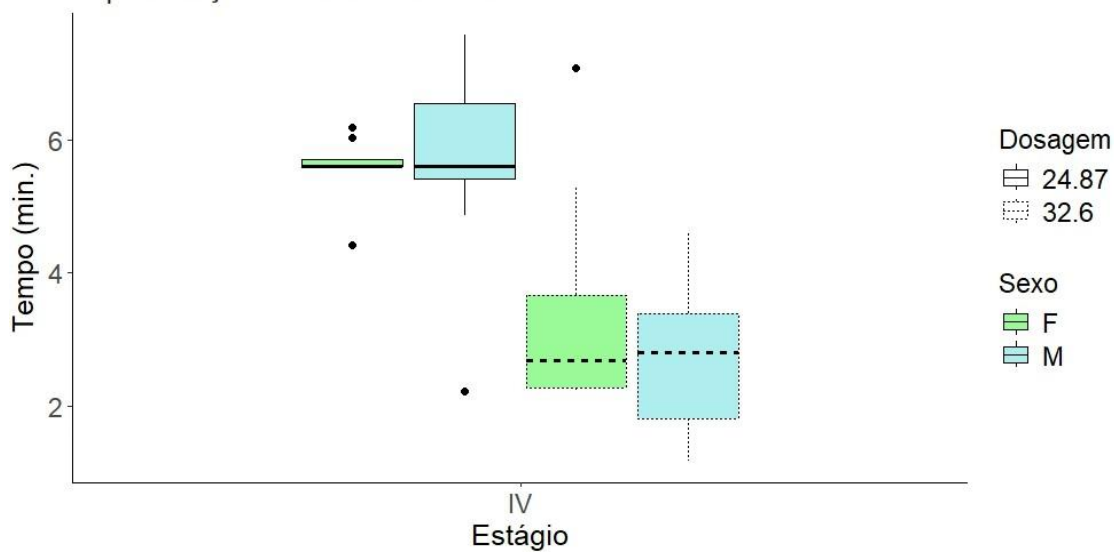


Figura 2. Tempo de indução a diferentes dosagens de eugenol em *Hypancistrus seideli* para o estágio IV

3.5 Recuperação anestésica

3.5.1 Concentração de 24,87 mg.L⁻¹

Houve efeitos significativos do tempo ($p < 0,001$), sexo ($p < 0,001$) e da variável k ($p < 0,001$) na dissimilaridade das amostras. Adicionalmente, a interação entre tempo e k foi significativa ($p < 0,001$), indicando que o efeito do tempo varia de acordo com o valor de k .

3.5.2 Concentração de 32,6 mg.L⁻¹

A avaliação da recuperação da concentração de 32,6 mg.L⁻¹ de eugenol mostrou que sexo ($\text{Pr}(>F) = 0,000999$), tempo ($\text{Pr}(>F) = 0,000999$) e k ($\text{Pr}(>F) = 0,000999$), foram significativos. O tempo ($R^2 = 0,81626$) foi a variável mais influente (81,63%). Além disso, houve uma interação significativa entre sexo associado ao k ($\text{Pr}(>F) = 0,000999$).

3.6 Comparação das recuperações dos tratamentos anestésicos

O menor tempo médio para alcançar o estágio IV da recuperação, no tratamento de 2 mg.L⁻¹/1min, 3 min 8s ± 1 min 40 s, foi apresentado por fêmeas reexpostas ao eugenol (Tabela 2). Mas no tratamento de 2 mg.L⁻¹/2 min foram machos expostos que entraram em menor tempo em fase de recuperação (3 min 20s ± 2 min 12s) (Tabela 3).

Tabela 2. Médias dos tempos de recuperação entre machos e fêmeas de *Hypancistrus seideli* que passaram pelo tratamento de exposição e reexposição de 2 mg.L⁻¹/1min

Exposição e Reexposição de 2 mg.L ⁻¹ /1min					
Sexo	*Tempo do Estágio I	*Tempo do Estágio II	*Tempo do Estágio III	*Tempo do Estágio IV	Tipo de Exposição
Machos	00:57 ± 0:54	02:00 ± 01:29	02:53 ± 01:47	03:55 ± 01:44	Exposição
Machos	01:34 ± 1:53	02:10 ± 02:29	03:18 ± 02:50	04:06 ± 03:20	Reexposição
Fêmeas	01:13 ± 1:02	01:34 ± 01:08	02:28 ± 01:30	03:08 ± 01:40	Exposição
Fêmeas	01:52 ± 1:26	02:27 ± 01:28	04:00 ± 01:56	05:02 ± 02:37	Reexposição

* O tempo está apresentado em minutos. Os dados estão representados em média ± desvio padrão

Tabela 3. Médias dos tempos de recuperação entre machos e fêmeas de *Hypancistrus seideli* que passaram pelo tratamento de exposição e reexposição de 2 mg.L⁻¹/2min

Exposição e Reexposição de 2 mg.L ⁻¹ /2min					
Sexo	*Tempo do Estágio I	*Tempo do Estágio II	*Tempo do Estágio III	*Tempo do Estágio IV	Tipo de Exposição
Machos	00:53 ± 0:42	01:38 ± 01:14	02:16 ± 01:19	03:20 ± 02:12	Exposição
Machos	01:20 ± 1:04	01:39 ± 01:16	03:02 ± 02:09	03:36 ± 02:10	Reexposição
Fêmeas	01:19 ± 0:45	01:50 ± 00:41	02:51 ± 01:02	03:57 ± 01:23	Exposição
Fêmeas	02:27 ± 1:33	03:45 ± 01:52	04:21 ± 01:59	05:10 ± 02:21	Reexposição

*O tempo está apresentado em minutos. Os dados estão representados em média ± desvio padrão

Para o teste de 2 mg.L em 1 e 2 minutos o tempo de recuperação foi igual na exposição quanto na reexposição para todos os estágios (Fig. 3). Porém no tratamento de 2mg.L⁻¹/2min machos entravam em estágio de anestesia antes das fêmeas em todos os estágios da exposição e reexposição.

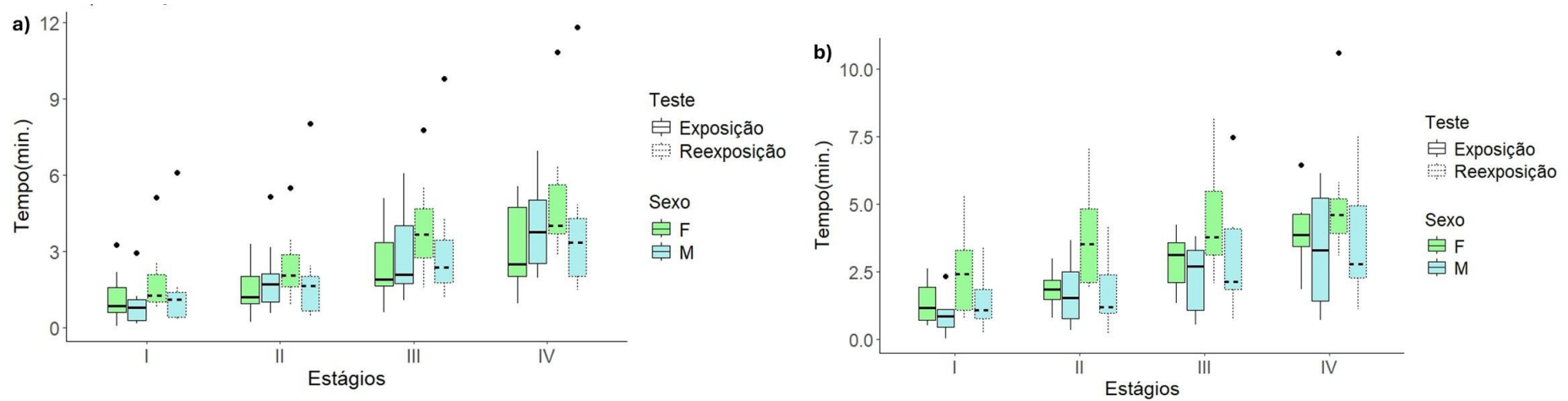


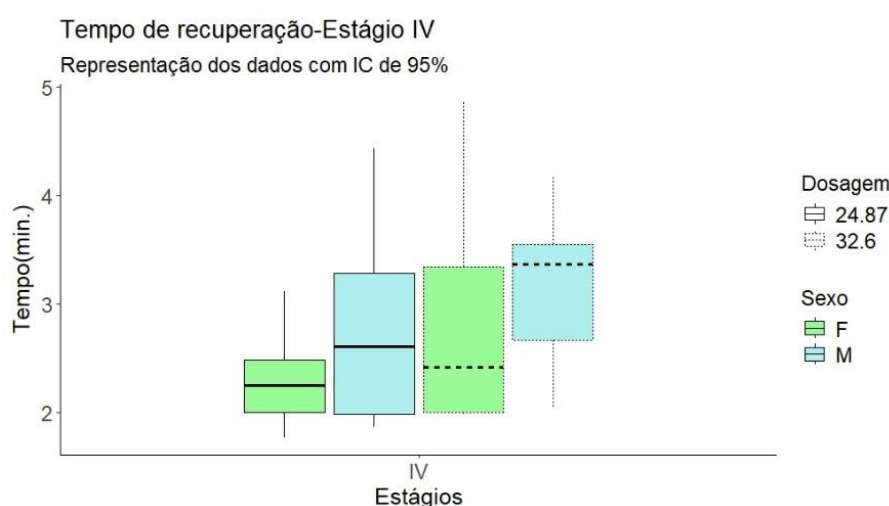
Figura. 3. Recuperações das exposições e reexposições ao eugenol em *Hypancistrus seideli* sob diferentes estágios a) tratamento de 2mg.L⁻¹/1min e b) tratamento de 2mg.L⁻¹/2mi

O menor tempo de recuperação pós-anestésica (2 min 18s ± 27s), ou seja, tempo necessário para atingir o estágio IV foi observado em fêmeas que receberam 24,87 mg.L⁻¹ (Tabela 4). O tempo de recuperação para o estágio IV foi igual entre fêmeas e machos da mesma concentração (Fig 4), e entre fêmeas que receberam 32,6 mg.L⁻¹, fêmeas e machos que receberam 24,87 mg.L⁻¹.

Tabela 4. Médias dos tempos de recuperação entre machos e fêmeas de *Hypancistrus seideli* que passaram pelo tratamento de dosagem única

Recuperação anestésica					
Sexo	*Tempo do Estágio I (s)	*Tempo do Estágio II (s)	*Tempo do Estágio III (s)	*Tempo do Estágio IV (s)	Concentração (mg.L ⁻¹)
Machos	01:20 ± 1:19	01:14 ± 01:03	01:59 ± 0:55	02:45 ± 00:54	24,87
Fêmeas	00:44 ± 0:15	01:23 ± 0:25	01:55 ± 0:26	02:18 ± 00:27	24,87
Machos	01:46 ± 0:55	02:13 ± 0:44	02:27 ± 0:45	03:09 ± 00:46	32,6
Fêmeas	01:19 ± 0:40	01:57 ± 0:50	02:18 ± 01:07	02:49 ± 01:02	32,6

* O tempo está apresentado em minutos. Os dados estão representados em média ± desvio



padrão

Figura. 4. Comparação entre as diferentes dosagens de eugenol no tempo de recuperação de *Hypancistrus seideli* para o estágio IV

Em nenhum dos tratamentos houve mortalidade de *H. seideli*. Também não foram registradas nenhuma morte durante meses pós experimentos (mais de 6 meses de observação, inclusive já reproduziram normalmente após os testes).

4. Discussão

Nesse trabalho, testamos na espécie de peixe endêmica do rio Xingu *Hypancistrus seideli* a dosagem de 2 mg.L de eugenol em dois tempos diferentes, 1 e 2 minutos, tanto para machos como para fêmeas, obtendo respostas diferentes para cada gênero. Ainda com os mesmos tratamentos testados acima, refizemos os ensaios com os mesmos animais após 3 meses e os machos e fêmeas seguiram apresentando respostas diferentes, não havendo diferença entre os tempos de anestesia e recuperação da primeira exposição e após 3 meses.

Nosso estudo encontrou que o melhor tempo de indução anestésica foi obtido da concentração resultante tratamento de 2 mg.L/1min (32,6 mg.L). Machos chegaram a anestesia com 2 min 46 s \pm 1 min 13 s, e as fêmeas com 3 min 27 s \pm 1 min 47 s. Para a recuperação tivemos, machos com 03 min 9 s \pm 46 s e nas fêmeas de 2 min 49 s \pm 1min 2s. Em um estudo de metanálise com anestésicos do grupo monoterpeneo, incluindo o eugenol, mostrou que o tempo médio de indução e recuperação foram respectivamente 2,2 e 4,7 minutos (Félix et al., 2023), tempos próximos aos encontrados para os machos desse estudo.

Marking e Meyer (1985) descrevem que o período ideal de anestesia é de no máximo 3 minutos para indução e no máximo 5 minutos para a recuperação. A importância da rapidez da anestesia em peixes é necessária, pois o processo de anestesia também gera a liberação de hormônios do estresse (corticosteróides e catecolaminas), sendo quanto mais rápida for a imobilização, menos desses hormônios entrarão na corrente sanguínea (Romaneli et al., 2018; Rothwell et al., 2005).

O sexo dos animais foi um fator que mostrou uma significativa diferença quanto à anestesia ao eugenol, em todos os tratamentos. A literatura aponta que diversos fatores biológicos, incluindo o sexo, influenciam a eficácia dos anestésicos (Sneddon, 2012), no entanto, existe uma lacuna no conhecimento sobre como anestésicos afetam machos e fêmeas nas diversas espécies de peixes (Mitjana et al., 2014).

Resultados semelhantes ao nosso trabalho também foram obtidos por Mitjana et al. (2018), que observaram diferenças entre machos e fêmeas nos tempos de indução e recuperação de guppies *Poecilia reticulata* e justificam que a diferença entre sexos é afetada pelo dimorfismo sexual, já que machos e fêmeas desta espécie apresentam tamanhos diferentes. Já Vercellini et al. (2024), que ao testarem eugenol em *Cnesterodon decemmaculatus*, não encontraram diferenças significativas nos tempos de indução e recuperação anestésica entre os sexos (Vercellini et al., 2024).

Quando testados exposição e reexposição após três meses, com o intuito de investigar se a concentração anestésica seria a mesma após este período, nossos resultados mostraram que para o tratamento de 1 minuto, a concentração foi uniforme em todos os estágios, tanto na exposição quanto na reexposição, sendo que no de 2 minutos, o estágio IV mostrou dosagens diferentes entre sexos e tipos de exposição. Compreender como a reexposição ao eugenol poderia afetar um peixe bastante comercializado como *H. seideli* foi de grande preocupação nesse trabalho, já que outros estudos trazem diferenças quando há reexposição.

E isso já pôde ser observado em peixes da mesma família que o *H. seideli*. Nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos de eugenol em *Baryancistrus xanthellus*, outro loricarídeo da bacia do rio Xingu, e os resultados mostraram uma tolerância inversa, já que os espécimes reexpostos mostraram sensibilidade a concentrações mais baixas de eugenol, atingindo estágios de anestesia mais rapidamente na reexposição (Nascimento et al., 2025).

Em *Oncorhynchus mykiss*, quando analisada a meia vida do eugenol, os resultados encontrados, 12 h do anestésico no sangue, sugeriram aos pesquisadores a ocorrência de bioacumulação no organismo dos animais devido à repetidas administrações do anestésico (Guénette et al., 2007). Em *Pterophyllum scalare* também observou-se a bioacumulação nos tecidos após à reexposição a anestésicos incluindo ao eugenol (Mitjana et al., 2014).

Nesse trabalho ainda testamos dosagens pontuais referentes à exposição ao eugenol, uma para a experimentação de 1 minuto, 32,6 mg.L⁻¹ e a outra para 2 minutos, 24,87 mg.L⁻¹ e observamos que os animais com melhores fator k anestesiaram melhor na maior concentração. O fator k atesta se os peixes estão com o peso ajustado ao comprimento (Barros et al., 2023), sendo que quando o k está muito distante do valor 1 ($k < 1$), tem-se uma condição de subnutrição, que pode resultar de uma baixa ingestão de calorias ou desequilíbrio na homeostase (Jisr et al., 2018).

Os espécimes de *H. seideli* avaliados neste estudo tiveram o fator k com variação entre 0,9 e 1,5, indicando que o peso deles estava adequado ao tamanho e estavam saudáveis. Valores baixos do fator k podem indicar um baixo fator de condição, resultando na modificação do metabolismo dos peixes, que influencia na interação dos indivíduos com o anestésico e tornando-os mais passíveis a doenças ou até levando os indivíduos a morte ((Millán-Ocampo et al., 2012; Barros et al., 2023). Hoseini et al. (2015) observaram na espécie *Pangasius hypthalmus* que a concentração e o peso dos peixes influenciaram significativamente na indução e recuperação anestésica.

A concentração de 32,6 mg.L⁻¹ de eugenol permitiu também a realização da anestesia e recuperação em tempo hábil. Para outras espécies de peixes amazônicos, como por exemplo, híbrido de juvenis *Pseudoplatystoma reticulatum* com *Leiarius marmoratus*, observou-se que a concentração de eugenol mínima ideal para sedação foi de 21,2 mg.L⁻¹ e para anestesia de 53,0 mg.L⁻¹ (De Oliveira et al., 2019). Já para *Arapaima gigas* a concentração ideal para anestesia foi de 60 mg.L⁻¹ (Honzaryk and Inoue, 2008). No entanto, Barbas et al. (2021b), ao expor juvenis de *Colossoma macropomum* em banhos anestésicos de curta duração em eugenol observaram mudanças comportamentais e excitabilidade neuronal similar à convulsão nos peixes testados.

Ainda que para *C. macropomum* o eugenol tenha uma resposta negativa de uso, em diferentes espécies de peixes seu uso tem mostrado de boa eficácia. Por exemplo, quando comparados eugenol, benzocaina e óleo de *Lippia alba*, aplicados as espécies de *Oreochromis niloticus* e *Apocorophium lacustris*, o eugenol levou os peixes a anestesia com três minutos a menos (Nascimento et al., 2020).

Em *Poecilia vivípara*, o tempo de sedação leve foi significativamente maior com o uso de eugenol quando comparados tal agente a benzocaina e MS-222 (Bolasina et al., 2017). O eugenol foi mais eficaz na anestesia de *Cyprinus carpio*, comparado aos anestésicos mentol e 1,8-cineol (Mazandarani and Hoseini, 2017), e em juvenis de *Mugil liza*, o tempo de recuperação foi diminuído com o aumento das concentrações de eugenol (Braz et al., 2017).

O conhecimento de cada espécie de peixe quanto a suas concentrações sedativas e anestésicas permite a realização de procedimentos como transporte, vacinação, marcação física, amostragem tecidual, biometria, coleta de sangue, cirurgias, reprodução artificial, fotografia, bem como outros procedimentos respeitando o bem estar animal (Barbas et al., 2021; Bodur et al., 2018).

Usar concentrações anestésicas de uma espécie para outra, sem a realização dos devidos testes, pode desencadear em erros graves, devido a diferenças fisiológicas, comportamentais e morfológicas entre espécies (Fujimoto et al., 2018; Jia et al., 2022). Por isso, para assegurar uma anestesia apropriada, a testagem de protocolos anestésicos em um número adequado de peixes, sob diversas condições, é necessária (Zahl et al., 2012).

5. Conclusão

A concentração de exposição efetiva para anestesia de *Hypancistrus seideli* com um bom fator k ocorreu com 32,6 mg.L⁻¹ de eugenol. Nesta concentração foi possível anestésiar 100% dos peixes e em tempo hábil. Para esta espécie, não houve diferença nas concentrações de exposição e reexposição e entre machos e fêmeas para a maioria dos estágios.

Os fatores sexo e k influenciaram a maior parte dos dados e o uso de eugenol em *H. seideli* não causou tolerância reversa na espécie. O protocolo utilizado neste trabalho foi efetivo e seguro para o uso de eugenol em espécimes de *H. seideli*, vindo os peixes até mesmo a reproduzirem, poucos meses após o experimento.

REFERÊNCIAS

- Araújo, J.G.D., Santos, M.A.S.D., Rebello, F.K., Isaac, V.J., 2017. Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. Bol. Inst. Pesca 43, 297–307. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n2p297>
- Aréchiga-Palomera, M.A., Figueroa-Salazar, A.G., Nieves-Rodríguez, K.N., Nolasco-Soria, H., Guerrero-Galván, S.R., Badillo-Zapata, D., Vega-Villasante, F., 2024. Putting the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae) to sleep: effects of clove oil and lidocaine anesthetic. Braz. J. Biol. 84, e271624. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271624>
- Barbas, L.A.L., Torres, M.F., Da Costa, B.M.P.A., Feitosa, M.J.M., Maltez, L.C., Amado, L.L., Toda, Y.P.S., Batista, P.D.S., Cabral, D.A.C., Hamoy, M., 2021. Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. Aquatic Toxicology 231, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105734>
- Barros, F.J.T., Rodrigues, E.L.C., Moura, M.C.D.S., Torres, R.D.A., Paula, E.A., Sousa, L.M., 2023. Weight-Length and Length-Length Relationships of the Endangered Zebra Pleco *Hypancistrus zebra* (Siluriformes, Loricariidae) from the Xingu River, Amazon, Brazil. Journal of Applied Ichthyology 2023, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2023/5158180>
- Bodur, T., Afonso, J.M., Montero, D., Navarro, A., 2018. Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus labrax* and *Argyrosomus regius*. Aquaculture 482, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.029>
- Bolasina, S.N., De Azevedo, A., Petry, A.C., 2017. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. Aquaculture Reports 6, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.002>
- Braz, R.D.S., Silva, I.D.O., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., Rodrigues, R.V., 2017. Benzocai--na, MS-222, eugenol e mentol como anestésicos para juvenis de tainha *Mugil liza*. Bol. Inst. Pesca 43, 605–613. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n4p605>
- Caldas, J.S., Da Silva, A.L., De Sousa, L.M., De Sousa, E.B., Monteiro, I.L.P., De Barros, F.J.T., Godoy, L., 2021. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and semen quality in the endangered Amazonian fish *Hypancistrus zebra* (Siluriformes, Loricariidae). Aquaculture 533, 736140. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736140>

Dagosta, F.C.P., Pinna, M.D., 2019. The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2019, 1. <https://doi.org/10.1206/0003-0090.431.1.1>

De Oliveira, C.P.B., Lemos, C.H.D.P., Vidal, L.V.O., Couto, R.D., Pereira, D.S.P., Copatti, C.E., 2019. Anaesthesia with eugenol in hybrid Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus*) handling: Biochemical and haematological responses. *Aquaculture* 501, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.046>

Félix, L., Vieira, R., Monteiro, S.M., Venâncio, C., 2023. A meta-analytic review of monoterpene for fish anaesthesia. *Fish and Fisheries* 24, 367–380. <https://doi.org/10.1111/faf.12731>

Fujimoto, R.Y., Pereira, D.M., Silva, J.C.S., De Oliveira, L.C.A., Inoue, L.A.K.A., Hamoy, M., De Mello, V.J., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2018. Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish Physiol Biochem* 44, 245–256. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>

Guénette, S.A., Uhland, F.C., Hélie, P., Beaudry, F., Vachon, P., 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266, 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>

He, R., Lei, B., Su, Y., Wang, A., Cui, K., Shi, X., Chen, X., 2020. Effectiveness of eugenol as an anesthetic for adult spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquaculture* 523, 735180. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735180>

Honzaryk, A., Inoue, L.A.K.A., 2008. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. *Cienc. Rural* 39, 577–579. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000084>

Hoseini, S.M., Rajabiesterabadi, H., Tarkhani, R., 2015. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. *Aquac Res* 46, 405–412. <https://doi.org/10.1111/are.12188>

Jia, Y., Xie, T., Gao, Y., Qin, H., Guan, C., 2022. Anesthetics efficacy and physiological response of MS222 and clove oil in spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture Reports* 25, 101201. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101201>

Jisr, N., Younes, G., Sukhn, C., El-Dakdouki, M.H., 2018. Length-weight relationships and relative condition factor of fish inhabiting the marine area of the Eastern Mediterranean city, Tripoli-Lebanon. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 44, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.11.004>

Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are Better Anesthetics Needed in Fisheries? *Fisheries* 10, 2–5. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1985\)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1985)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2)

Mazandarani, M., Hoseini, S.M., 2017. Menthol and 1,8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Aquac Res* 48, 3041–3051. <https://doi.org/10.1111/are.13136>

Millán-Ocampo, L., Torres-Cortés, A., Marín-Méndez, G.A., Ramírez-Duart, W., Vásquez-Piñeros, M.A., Schroniltgen Rondón-Barragán, I., 2012. CONCENTRACIONES ANESTÉSICA DEL EUGENOL EN PECES ESCALARES (*Pterophyllum scalare*). *Rev. investig. vet. Perú* 23, 171–181. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.897>

Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Falceto, M.V., Esteban, J., Josa, A., Espinosa, E., 2014. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine

methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture* 433, 491–495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.013>

Mitjana, O., Bonastre, C., Tejedor, M.T., Garza, L., Esteban, J., Falceto, M.V., 2018. Simultaneous effect of sex and dose on efficacy of clove oil, tricaine methanesulfonate, 2-phenoxyethanol and propofol as anaesthetics in guppies, *Poecilia reticulata* (Peters). *Aquac Res* 49, 2140–2146. <https://doi.org/10.1111/are.13668>

Nascimento, H.D.S., Crispim, B.D.A., Francisco, L.F.V., Merey, F.M., Kummrow, F., Viana, L.F., Inoue, L.A.K.A., Barufatti, A., 2020. Genotoxicity evaluation of three anesthetics commonly employed in aquaculture using *Oreochromis niloticus* and *Astyanax lacustris*. *Aquaculture Reports* 17, 100357. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100357>

Nascimento, T.P., Barros, F.J.T., Couto, O.L.P., Paz, M.D.R., Junior, S.V.N., Sousa, L.M., Pereira, T.S., 2025. Anesthesia of *Baryancistrus xanthellus* (Siluriformes: Loricariidae): Bioassays with exposure and re-exposure cause reverse tolerance to eugenol. *Aquaculture Reports* 42, 102807. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2025.102807>

Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., Santoso, J., 2019. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquaculture and Fisheries* 4, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.03.002>

Reis, R.G.A., Alves, P.C.J., Abe, H.A., Costa Sousa, N., Paixão, P.E.G., Palheta, G.D.A., Melo, N.F.A.C., Fujimoto, R.Y., Luz, R.K., Takata, R., 2021. Feed management and stocking density for larviculture of the Amazon ornamental fish L333 king tiger pleco *Hypancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae). *Aquaculture Research* 52, 1995–2003. <https://doi.org/10.1111/are.15047>

Ribeiro, P.A.P., De Melo Hoyos, D.C., De Oliveira, C.G., Flora, M.A.L.D., Luz, R.K., 2019. Eugenol and benzocaine as anesthetics for *Lophiosilurus alexandri* juvenile, a freshwater carnivorous catfish. *Aquacult Int* 27, 313–321. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0326-3>

Romaneli, R.D.S., Boaratti, A.Z., Rodrigues, A.T., Queiroz, D.M.D.A., Khan, K.U., Nascimento, T.M.T., Fernandes, J.B.K., Mansano, C.F.M., 2018. Efficacy of Benzocaine, Eugenol, and Menthol as Anesthetics for Freshwater Angelfish. *J Aqua Anim Hlth* 30, 210–216. <https://doi.org/10.1002/aah.10030>

Rothwell, S.E., Black, S.E., Jerrett, A.R., Forster, M.E., 2005. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 140, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.007>

Šimková, A., Hyršl, P., Halačka, K., Vetešník, L., 2015. Physiological and condition-related traits in the gynogenetic-sexual *Carassius auratus* complex: different investments promoting the coexistence of two reproductive forms? *BMC Evol Biol* 15, 154. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0438-6>

Sneddon, L.U., 2012. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *Journal of Exotic Pet Medicine* 21, 32–43. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.11.009>

Sousa, L.M.D., Sousa, E.B.D., Ribeiro, R.D.O., Sabaj, M.H., Zuanon, J., Py-Daniel, L.R., 2025. Two new species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Xingu, Amazon, Brazil. *Neotrop. ichthyol.* 23, e240080. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2024-0080>

Vercellini, M.C., Rearte, R., Di Cesare, L., Ayala, M.A., Montes, M.M., 2024. Eugenol as anesthetic for *Cnesterodon decemmaculatus* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Lab Anim* 58, 44–51.

<https://doi.org/10.1177/00236772231192020>

Viegas, R.M., França, C.L., Castro, J.S., Castro, J.J.P., Santana, T.C., Costa-Lima, M.P.G., Neta, R.N.F.C., Carreiro, C.R.P., Teixeira, E.G., 2020. Eugenol as an efficient anesthetic for neotropical fish *Prochilodus nigricans* (Teleostei, Prochilodontidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 72, 1813–1820. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11866>

Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem* 38, 201–218. <https://doi.org/10.1007/s10695-011>