

Benzocaína y mentol como anestésicos en machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792).

Cortes - García A y Rodríguez - Gutiérrez M.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Departamento El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Reproducción, Genética y Sanidad Acuícola. Calzada del Hueso 1100. Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán. C. P. 04960. Distrito Federal. México. Tel. 5483 74 94.

* E- mail: rogm0211@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Se comparó la eficiencia de benzocaína y mentol en machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de tres años, con un peso promedio de $1,590 \pm 0.2$ g y una longitud patrón 46.60 ± 2.3 cm. En la evaluación se consideraron tres tiempos: sedación (TS), manipulación (TM) y recuperación (TR). Los anestésicos se prepararon a partir de soluciones madre: benzocaína: 12 g en un litro de alcohol y se empleó en dosis de 3 mL L^{-1} de agua. Para mentol con 100 g L^{-1} de alcohol y se empleó 1 mL L^{-1} de agua. Los resultados con benzocaína fueron: TS 225.50 ± 96 seg; TM 153 ± 37 seg y TR 325 ± 248 seg mientras que para mentol se obtuvo TS 244 ± 80 seg; TM 152.6 ± 37 seg y TR 399 ± 163 seg. Los organismos se sedaron y se recuperaron más rápido con benzocaína. El ANDEVA solo señaló diferencias significativas ($P < 0.05$) en el TR entre los tratamientos. La sedación de los organismos utilizando ambos anestésicos permitió la manipulación durante 152 seg, tiempo suficiente para la determinación de los parámetros morfométricos o bien para muestreos de otro tipo como obtención de semen, muestreo sanitario, entre otros. Con ambos tratamientos se tuvieron en promedio en TS= 234 seg y en TR 362 seg. En ninguno de los tratamientos se observó mortalidad después de las 24 horas. Los dos anestésicos están disponibles en el mercado y tienen bajo costo, por lo que se recomiendan en la manipulación de ésta especie con alto valor comercial.

Palabras claves: acuicultura, anestesia, sedación, recuperación

ABSTRACT

The efficiency of benzocaine and menthol in rainbow trout males (*Oncorhynchus mykiss*) of three years old, with an average weight of $1,590 \pm 0.2$ g and a pattern length of 46.60 ± 2.3 cm was compare. In evaluation, it was consider three times: sedation (ST), manipulation (MT) and recovery (RT). Anesthetics were prepared from stock solutions: benzocaine: 12 g in a litter of alcohol and it was use in doses of 3 mL L^{-1} of water. For menthol with 100 g L^{-1} of alcohol and 1 mL L^{-1} of water was use. Results with benzocaine were ST 225.50 ± 96 sec; MT 153 ± 37 sec and RT 325 ± 248 sec while in menthol it was obtain ST 244 ± 80 sec; MT 152.6 ± 37 sec and RT 399 ± 163 sec. Organisms were sedate and recover faster with benzocaine. ANDEVA just pointed out significate differences ($P < 0.05$) and in RT between treatments. Organisms sedation using both anesthetics allow manipulation during 152 sec, enough time for morphometric parameters determination or for other type of sampling like semen obtention, sanitary sampling, among others. With both treatments it was obtained an average of ST= 234 sec and in RT 362 sec. In any treatment, mortality was observe after 24 hours. Both anesthetics are available in markets and have low prices, so it was recommend in manipulation of this species with high commercial value.

Key words: aquaculture, anesthesia, sedation, recovery

INTRODUCCIÓN

Los anestésicos en los organismos tienen como finalidad minimizar el estrés, sobre todo durante la

Anestésicos para trucha arco iris
Cortes - García A y Rodríguez - Gutiérrez M.

manipulación, porque afecta negativamente su fisiología (Ashley 2007) y en los organismos acuáticos, sobre todo en machos que por su naturaleza hormonal son más agresivos, se recomienda su empleo para facilitar el manejo en diversos procedimientos tales como: biopsias, transportación, inducción a la reproducción, extracción de gametos, toma de medidas y peso (Rodríguez *et al.* 2013).

En general, los organismos presentan menos resistencia al manejo cuando están bajo los efectos de algún anestésico, lo cual reduce la incidencia de traumas durante la manipulación, debido a su nerviosismo y alteración se propician caídas, que pueden causar lesiones graves como daños internos en ovarios o testículos o la remoción del mucus y escamas, favoreciendo la entrada de bacterias patógenas oportunistas (Soto y Burhanuddin 1995).

Los anestésicos en los organismos acuáticos en general se aplican en el agua, de tal manera que deben cumplir con algunas características como: ser solubles, tener tiempos breves de inducción y recuperación y además de que ésta última sea espontánea, así como un amplio factor de seguridad, no tóxicos para los organismos ni el hombre, no dejar residuos y permitir, si se requiere, la intensificación de la anestesia (Simões y Gomes 2009).

Entre los anestésicos más utilizados en acuicultura están: metanosulfonato de triclaína o MS 222, propanidina (Jeney *et al.* 1986), xilocaína (Rodríguez-Gutiérrez y Esquivel-Herrera 1995), Benzocaína (Gilderhus 1990, Gomes 2001) y 2-fenoxietanol (Quinn *et al.* 1988), los tres primeros requieren de importación lo que incrementa su costo; debido a ello, se están investigando opciones entre las que destacan aceite de clavo y mentol, que por ser “naturales” son una alternativa viable porque son de fácil obtención en el mercado y de costos accesibles.

El aceite de clavo ha sido empleados en distintas especies como: *Carassius carassius* y *Cyprinus carpio* (Endo *et al.* 1972); *Centropomus striata* (King *et al.* 2005); *Ictalurus punctatus* (Waterstrat 1999); *Liza parsia* (Sonawane y Kulkarni 2001); *Oncorhynchus tshawytscha* (Cho y Heath 2000); *Phoxinus erythrogaster* (Detar y Mattingly 2005); *Xiphophorus helleri*, *Trichogaster leeri* y *Micropterus*

dolomieu (Peake 1998); *Seriola dimerii* (García-Gómez *et al.* 2002); *Centropomus parallelus* (Tsuzuki y Berestinas 2008) y trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Keene *et al.* 1998).

El mentol se ha utilizado ampliamente para anestesiados marinos (Ruppert y Barnes 1996) y ha sido poco utilizado en peces como *Colossoma macropomum* (Gomes *et al.* 2001), *Centropomus parallelus* (Souza *et al.* 2012), *Oreochromis niloticus* (Simões y Gomes 2009). Sin embargo, faltan estudios sobre el tiempo de eliminación y se ha empleado como alternativo al MS 222 por ser menos costoso (Gomes *et al.* 200; González y González 2007).

Por otro lado, la concentración de anestésico en músculo de acuerdo con Noga (1996) y Stoskopf (1993) deben ser superiores a 0.1 mg kg⁻¹ para ser detectable. Los estudios sobre la eliminación de anestésicos en peces son diversos: Allen (1988) en trucha y lobina negra no detectó benzocaína en músculo después de 24 horas, mientras que en el salmón rojo el MS 222 era detectable después de 21 días (Wood *et al.* 2002) y el aceite de clavo en el salmón real, se metabolizó en menos de 24 h (Cho y Heath 2000).

Lo anterior denota que cada anestésico tiene particularidades además de que el pez al contacto tiene reflejos de resistencia que pueden ser intensos o leves y que alteran los niveles de coagulación, glucosa, cortisol y colesterol (Wedemeyer 1970).

Por la importancia que tiene el minimizar el estrés durante la manipulación de los organismos acuáticos, el presente estudio tiene como objetivo comparar el efecto anestésico de benzocaína y mentol en machos de trucha arco iris con edad promedio de tres años.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de organismos

Se obtuvieron 30 reproductores de las instalaciones del Centro Acuícola el Zarco, Mpo. de Ocoyuacac, Edo. de México (Fig.1). Los organismos utilizados fueron del estadio adulto de tres años de

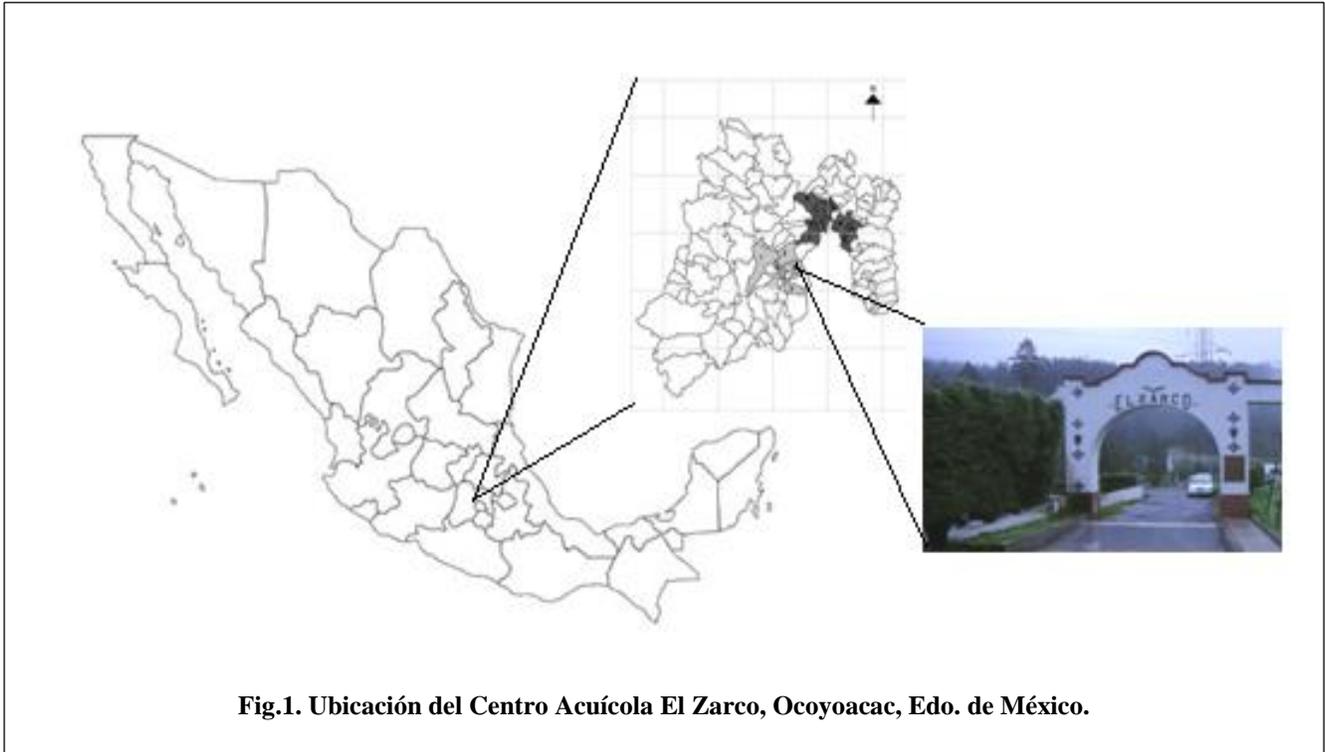


Fig.1. Ubicación del Centro Acuícola El Zarco, Ocoyoacac, Edo. de México.

edad, con longitud patrón promedio de 46.6 ± 2.3 cm y peso promedio de $1,590 \pm 0.2$ g.

Diseño experimental

El estudio consideró como variables el tiempo de sedación (TS), el tiempo de manipulación (TM) y el tiempo de recuperación (TR), cada uno fue registrado con un cronómetro y en formatos de control de anestesia.

Los peces durante la sedación se colocaron en recipientes de 40 L de uno por uno, cambiándolo cada 5 organismos. La dosis utilizada fue 3 mL de solución madre de benzocaína y de 1 mL de solución madre de mentol, por litro de agua.

El estudio se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura del agua $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ con pH de 8.

Preparación de los anestésicos

La solución madre de benzocaína se hizo con 12 g y mentol con 100 g, mismos que se diluyeron en 1 L de alcohol.

Tiempo de sedación (TS)

El tiempo de sedación fue a partir de que los organismos se introdujeron en la solución hasta la sedación, cuando se extraía de la solución anestésica. Un organismo se consideró sedado cuando se iba de lado y perdía el equilibrio, se iba al fondo de lado, reducía el movimiento opercular y al tocarlo ya no se alejaba (Stoskopf 1993).

Tiempo de manipulación (TM)

Este periodo considera el tiempo para hacer algún procedimiento sanitario, muestreo gonádico o merístico y comienza al momento en que se extrae al organismo de la solución anestésica, y culmina en el

instante en que se introducía al agua para su recuperación.

En éste caso el TM se estandarizó para obtener la biometría: longitud total, patrón y cefálica, así como la altura y el grosor, con un ictiómetro modificado de 60 cm. Además, se tomó el peso (g) con una balanza marca Adam con capacidad máxima de $32 \text{ kg} \pm 1 \text{ g}$.

Tiempo de recuperación (TR)

El TR se contabilizó desde el momento en que el organismo se introducía en el flujo de agua del estanque y terminaba cuando recuperaba el equilibrio y comenzaba a desplazarse de forma normal.

Análisis de los resultados

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico Statistica 9 se empleó el ANDEVA de una vía y sí había diferencias, se aplicó la prueba de Tukey para la comparación de medias múltiples. En todos los análisis se utilizó un nivel de significancia del 95% (Zar 1996).

RESULTADOS

En los peces se observó menor resistencia al entrar en contacto con benzocaína y en cuanto al tiempo de sedación promedio con benzocaína (TSB) fue de 225.50 ± 96 seg y con mentol (TSM) 244 ± 80 seg, lo que significa que tardaron en promedio 234 seg en sedarse.

El TM con benzocaína (TMB) fue de 153 ± 37 seg y con mentol (TMM) 152.6 ± 37 seg, periodo en que los organismos se mantuvieron fuera del agua y se manipularon por más de 152 seg, para obtener en éste caso los parámetros de longitudes y peso.

El análisis de varianza no determinó diferencias significativas para el TS ($P=0.535$) y TM ($P=0.906$) y las desviaciones fueron similares (Fig. 2).

En cuanto al TR promedio con benzocaína (TRB) fue de 325 ± 248 seg y con mentol (TRM) 399 ± 163 seg. El análisis de varianza determinó

diferencias significativas ($P<0.05$) (Fig. 2), teniendo benzocaína el menor TR (Fig.2).

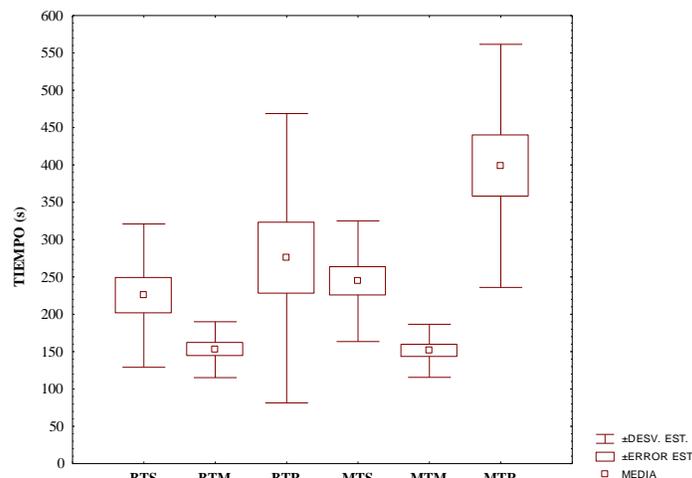


Fig.2. Comparación de medias de tiempos de sedación (TS), manipulación (TM) y recuperación (TR) con los anestésicos benzocaína (B) y mentol (M).

DISCUSIÓN

Según Marcado y Meyer (1985) es un buen anestésico aquel que induce la sedación en menos de 180 seg y la recuperación se presenta en menos de 300 seg. Considerando lo anterior, los dos anestésicos de éste estudio tienen un TS y TR ligeramente superiores a los recomendados, pero, por otro lado, permitieron la manipulación adecuada de los organismos durante la medición, ambos se obtienen con facilidad en el mercado y a bajo costo además de que no se registró mortalidad durante el ensayo ni 24 horas después.

El tiempo promedio de sedación registrado con ambos anestésicos fue de 234 seg, valor por arriba de lo obtenido por Gilderhus (1990) en juveniles del salmón del Pacífico o salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) utilizando MS222 a concentración de 30 mg L^{-1} y aceite de clavo a 25 mg L^{-1} obteniendo en promedio 180 y 125 seg respectivamente, con temperatura del agua de $10 - 13 \text{ }^\circ\text{C}$. Si bien, el TS fue

menor es probable que se deba a la talla de los peces y la concentración de los anestésicos, sin embargo, refiere que las truchas presentaron deficiencia en la actividad respiratoria.

Souza *et al.* (2012) reportan que anestesiaron juveniles de robalito (*Centropomus parallelus*) con mentol a concentración de 150 mg L⁻¹ y registraron tiempos promedio de TS 120 seg y de TR de 142 seg siendo menores a los determinados en el presente estudio, la diferencia se atribuye a que la concentración de cada anestésico tiene un comportamiento específico en que además hay que considerar la talla y peso de los organismos.

En el pámpano (*Trachinotus marginatus*) en estadio juvenil, Okamoto *et al.* (2009) compararon la eficiencia de benzocaína en diferentes concentraciones a 25 mg L⁻¹ el TS fue de 660 seg y TR de 180 seg mientras que con 150 mg L⁻¹ el TS fue de 120 seg y TR de 840 seg, encontrando que a mayor concentración TS es inversamente proporcional y TR es inversamente proporcional; en comparación con los obtenidos en este estudio el TS fue mayor y el TR fue menor, si bien el TR puede ser excesivo para los peces en ambos estudios no mostraron signos de irritación en la piel u otra reacción como lo reportan Ross *et al.* (2007) quienes encontraron que en el aterínido, *Menidia estor*, con benzocaína a 40 mg L⁻¹ la anestesia fue rápida y profunda pero resultó con algunas muertes después de una hora de exposición, por lo que recomiendan no utilizar dosis mayores a 30 mg L⁻¹ para esta especie.

Façanha y Gomes (2005) en juveniles de pacu (*Colossoma macropomum*) utilizaron mentol a 100 mg L⁻¹, y obtuvieron en promedio para el TS 120 y 300 seg para TR demuestran que a mayor concentración 250 mg L⁻¹ menor TS pero mayor TR; también señalan que la exposición al mentol no causó alteraciones en la concentración de glucosa y Na⁺ plasmáticos en sangre, dos indicadores de estrés. Mientras que los resultados obtenidos en la presente investigación con reproductores de trucha los TS y TR fueron mayores.

En contraste Simões y Gomes (2009) en la mojarra (*Oreochromis niloticus*) utilizando mentol a 100 mg L⁻¹ obtuvieron en TS entre 300 - 330 seg, es decir, un valor por encima al obtenido en el presente

estudio, aunado a esto, sus resultados demostraron que a concentración mayores a 50 mg L⁻¹ produjo aumento de glucosa en la sangre y por lo tanto estrés.

Por otro lado, Gholipour (2013) en juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de 100 g, con MS-222 a 50 mg L⁻¹ y aceite de clavo a 25 mg L⁻¹, encontró en promedio para el primero: TS 114 ±11 seg, TR 150 ±20 seg, mientras que para el segundo fue: TS 125 ±23 y en TR 180 ±12 seg. Comparando sus resultados con los del presente estudio se observa que los tiempos fueron menores; sin embargo, aunque es la misma especie la diferencia se atribuye al estadio de desarrollo y peso de los organismos.

Sin embargo, de acuerdo con Wedemeyer (1970) uno de los principales inconvenientes de MS 222 es que incluso aun cuando los peces se anestesian y recuperan rápidamente, aumenta los niveles de cortisol en plasma. Por otro lado, Coyle *et al.* (2004) indicaron que disminuye el pH del agua, lo cual es la causa de irritación del epitelio olfatorio y los resultados obtenidos por Quinn *et al.* (1998) señalan que el daño al epitelio olfatorio ocasiona problemas cuando crían, ya que provoca cambios en el comportamiento que afectan el desove.

Según Façanha y Gomes (2005) y Gonçalves *et al.* (2008) el mentol es un anestésico eficiente; sin embargo, se debe tener en cuenta la concentración para evitar producir estrés en los peces, aunque se obtiene de una planta medicinal, no se tienen estudios sobre la posible permanencia de residuos en músculo que produzca cambio en el sabor, así como los del impacto en el sistema inmunológico.

Finalmente como se observa en la Fig. 2, el TS y TM fue similar con ambos anestésicos, es decir, la inducción fue relativamente rápida de 234 seg y el TM con 152 seg es suficiente para realizar la toma de parámetros merísticos o algún otro tipo de muestreo como sanitario o de manipulación durante la inducción al desove entre otros; de tal manera que el TR que se determinó se atribuye a las características intrínsecas de cada anestésico, obteniéndose un tiempo menor de 325 seg con benzocaína y 399 seg con mentol.

El funcionamiento de los anestésicos depende de la especie y estadio de desarrollo (Cassara *et al.* 1999; Small 2003 y Rodríguez *et al.* 2013),

características físico químicas del agua (Carrasco *et al.* 1984) y concentración (Souza *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

Benzocaina y mentol utilizados para sedar adultos machos de trucha arco iris son adecuados porque con ambos el TS fue en promedio de 234 seg, mientras que el TR fue de 325 seg con benzocaína y 399 seg con mentol.

El TM en promedio fue de 152 seg tiempo para realizar la manipulación de los organismos en distintos procedimientos.

Ambos anestésicos son recomendados para trucha en estadio adulto, porque permiten la manipulación y no se presenta mortalidad incluso 24 h después, son accesibles y económicos.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Subdelegación de Pesca del Estado de México, por las facilidades brindadas, en el Centro Acuícola el Zarco y a los alumnos de la carrera de Biología del quinto trimestre de la UAM-X.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen JL. 1988. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. *Progressive Fish-Culturist*, Bethesda 50(1):59-60.
- Ashley PJ. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 199-235.
- Carrasco SH, H Sumano, R Navarro-Fierro. 1984. The Use of Lidocaine-Sodium Bicarbonate as Anaesthetic in Fish. *Aquaculture* 41: 395-398.
- Cassará C, SE Gómez, A Giusto, RA Ferriz y V. Asikian. 1999. Resistance to different toxics and anaesthetics in *Poecilia reticulata* Peters, 1958. *Bioikos* 13(1/2):29-39.
- Cho GK, y DD Heath. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum). *Aquaculture Research* (31): 537-546.
- Cotter P y K Rodnick. 2006. Differential Effects of Anesthetics on Electrical Properties of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 145:158-165.
- Coyle SD, RM Durborow y JH Tidwell. 2004. Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. Publication No 3900. Kentucky State University Aquaculture Research Center, Texas, USA.
- Detar JE y HT Mattingly. 2005. Response of the Southern Redbelly dace to clove oil and MS-222: effects of anaesthetic concentration and water temperature. *In: Proceedings of the annual conference of the South-eastern Association of Fish and Wildlife Agencies* 58:219-227.
- Endo T, K Ogihima, H Tanaka y S Oshima. 1972. Studies on the anaesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38:761-767.
- Façanha MF y LC Gomes. 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazónica* 35(1):71-75.
- García-Gómez A, F Gandara y T Raja. 2002. Use of clove, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry), oil as a cost-effective anaesthetic for routine tasks in handling cultured marine fish. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18: 21-23.
- Gilderhus A. 1990. Benzocaine as a Fish Anesthetic: Efficacy and Safety for Spawning-Phase Salmon. *The Progressive Fish Culturist* 52: 189-191.
- Gomes LC, AR Chippari-Gomes, NP Lopes, R Roubach, CAR Araujo-Lima. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32:426-431.
- Gonçalves AFN, EC Santos, JBK Fernandes, LS Takahashi. 2008. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum Animal Science* 30(3): 339-344.
- González CA y JF González (2007). Comparación del efecto anestésico entre mentol y metansulfonato de tricaina en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) y

- yamu (*Brycon amazonicus*). Revista Médica Veterinaria y Zootecnia. 54(2): 220 – 221.
- Green, CJ. 1982. Laboratory animal handbook 8. Animal anesthesia. London: Laboratory Animals Ltd.
- Jeney Z, G Jeney, J Oláh, A Siwicki y I Danko. 1986. Propanidid a New Anaesthetic for Use in Fish Propagation. Aquaculture 54: 149-156.
- Keene J, D Noakes, R Moccia y C Soto. 1998. The Efficacy of Clove Oil as an Anaesthetic for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Aquaculture Research 29: 89-101.
- King W, B Hooper, S Hillsgrove, C Benton y DL Berlinsky. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricainemetha-nesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). Aquatic Research 36:1442–1449
- Lorenzo D, D Paz, E Dellesaca, P Davies, R Vila y S Cañigüeral. 2002. Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. Brazilian Archives of Biology and Technology 4 (45): 519-524.
- Noga EJ. 1996. Fish Disease: Diagnosis & Treatment. St. Louis (USA): Mosby. Chapter 22. General Concepts in Therapy. pp. 253 – 270.
- Peake S. 1998. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. North American Journal of Fisheries Management 18:919–924.
- Quinn T, A Olson y J Konecki. 1988. Effects of Anaesthesia on the Chemosensory Behaviour of Pacific Salmon. Journal Fish Biology 33: 637-641.
- Rodríguez GM, GA Cortés y GD Contreras. 2013. Comparación del Aceite de clavo y la benzocaína como anestésicos en el manejo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Avances de las mujeres en las ciencias las humanidades y todas las disciplinas (2):29-33.
- Rodríguez-Gutiérrez M y A Esquivel-Herrera. 1995. Evaluation of the Repeated Use of Xylocaine as Anesthetic for the Handling of Breeding Carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 129: 431-436.
- Ross L, G Ross, JB Sánchez, C Martínez-Palacios, SI Racotta y MC Toledo. 2007. Anesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia. Aquaculture Research 38:909-917.
- Simões L y L Gomes. 2009. Eficácia do Mentol como Anestésico para Juvenis de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 61 (3): 613-620.
- Small BC. 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 218: 177 – 185.
- Sonawane UD y GN Kulkarni. 2001. Anaesthetic effects of clove oil and sodium bicarbonate on the fry of *Liza parsia*, Iranian Journal Fish Science 3:49–62
- Soto GC y S. Burhanuddin. 1995. Clove Oil as a Fish Anaesthetic for Measuring Length and Weigh of Rabbitfish (*Siganus lineatus*). Aquaculture 136: 149-152.
- Souza R A, CV Carvalho, FF Nunes, BR Scopel, JD Guarizi y MY Tsuzuki. 2012. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. Bol Inst Pesca, 38: 247-255.
- Stoskopf M. 1993. Anaesthesia. In: Brown L. (Eds). Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine. London, UK: Pergamon Veterinary Handbook Series. 161- 168.
- Tsuzuki MY y AC Berestinas. 2008. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. 34(4): 535-541.
- Waterstrat P. 1999. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. Journal of World Aquaculture Society, Baton Rouge, 30(2): 250-255.
- Wedemeyer G. 1970. Stress of Anesthesia with MS-222 and Benzocaine in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canadá 27: 909-914.
- Wood CA, J Nelson y K Ramstad. 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. Journal of Fish Biology (60): 340-347.
- Zar JH. 1996. Biostatistical Analysis. Third edition. Prentice-Hall, New Jersey. 718 p.