

## Eficacia del eugenol como anestésico en el chame *Dormitator latifrons* mantenidos a dos salinidades

Efficacy of eugenol as anesthetic in the chame *Dormitator latifrons* maintained at two salinities

Daniela Zambrano-Bermúdez<sup>1,2</sup>, Ana María Santana-Piñeros<sup>2\*</sup>, Leonela Griselda Muñoz-Chumo<sup>1,2</sup>, Juan Carlos Velez-Chica<sup>2</sup>, Yanis Cruz-Quintana<sup>2</sup>

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el tiempo de inducción y de recuperación de *Dormitator latifrons* mantenidos en agua dulce y salobre, expuestos a cuatro dosis de eugenol. Un total de 240 organismos fueron transferidos individualmente a un acuario con 15 L de agua dulce (0 UPS) o agua salobre (20 UPS) con la dosis de eugenol de cada tratamiento (42.5, 85, 170 y 255 mg/L). En cada tratamiento se analizaron 30 peces. El tiempo de inducción no mostró diferencias significativas entre niveles de salinidad, en tanto que el tiempo de recuperación fue significativamente mayor en agua salobre (706 s) que en agua dulce (507 s) ( $p < 0.05$ ). En ambas salinidades, el incremento de la dosis de eugenol disminuye el tiempo de inducción e incrementa el tiempo de recuperación. Los resultados indican que la dosis eficaz de eugenol para *D. latifrons* es de 170 mg/L en ambas salinidades; sin embargo, para procedimientos de corta duración sería suficiente una inmersión en una dosis de 42.5 mg/L para lograr una sedación.

**Palabras clave:** aceite de clavo, tiempo de inducción, tiempo de recuperación, especie anfídroma, Eleotridae

<sup>1</sup> Facultad de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí, Ecuador

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Sanidad Acuicola, Inocuidad y Salud Ambiental (SAISA), Carrera de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables, Facultad de Acuicultura y Ciencias del Mar, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador

\* E-mail: [ana.santana@utm.edu.ec](mailto:ana.santana@utm.edu.ec)

Recibido: 25 de enero de 2023

Aceptado para publicación: 4 de junio de 2023

Publicado: 25 de agosto de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the induction and recovery time of *Dormitator latifrons* maintained in fresh and brackish water, exposed to four doses of eugenol. A total of 240 organisms were individually transferred to an aquarium with 15 L of fresh water (0 UPS) or brackish water (20 UPS) with the eugenol dose of each treatment (42.5, 85, 170 and 255 mg/L). In each treatment, 30 fish were analysed. The induction time did not show significant differences between salinity levels, while the recovery time was significantly higher in brackish water (706 s) than in fresh water (507 s) ( $p < 0.05$ ). In both salinities, increasing the eugenol dose decreases the induction time and increases the recovery time. The results indicate that the effective dose of eugenol for *D. latifrons* is 170 mg/L in both salinities; however, for short-term procedures, immersion at a dose of 42.5 mg/L would be sufficient to achieve sedation.

**Key words:** clove oil, induction time, recovery time, amphidromous species, Eleotridae

## INTRODUCCIÓN

La anestesia se utiliza en estudios de biología y acuicultura con el fin de reducir el estrés y relajar a los peces para procedimientos rutinarios como medición, reproducción artificial, cirugía, marcaje, captura y transporte (Manuel *et al.*, 2014). La manipulación de los peces durante los procesos de investigación aumenta el riesgo de lesiones internas y externas, lo que puede ocasionar una disminución en el funcionamiento del sistema inmune, ocasionando enfermedad o muerte (Caudill *et al.*, 2014; Tacchi *et al.*, 2015). Estos efectos pueden disminuirse con el uso de anestésicos o analgésicos, los cuales producen relajación muscular, estabilización autonómica, analgesia, inducen inconsciencia y reducen el metabolismo, consumo de oxígeno y excreción (Bodur *et al.*, 2018; Aydın y Barbas, 2020).

El eugenol o aceite de clavo es el anestésico natural más comúnmente utilizado en investigación acuícola, biológica y pesquera (Sindhu y Ramachandran, 2013), ya que sus derivados (eugenol, isoeugenol y metileugenol) se encuentran ampliamente disponibles, son económicos y no son sustancias controladas (Kamble *et al.*, 2014; Fernandes

*et al.*, 2017). Se ha demostrado que los derivados del eugenol se metabolizan rápido y son efectivos en especies de peces de agua dulce (Caudill *et al.*, 2014; Bowker *et al.*, 2015) y marina (Trushenski *et al.*, 2012; Christiansen *et al.*, 2013; Silbernagel y Yochem, 2016), considerando como adecuado su empleo en condiciones de laboratorio (Sladky *et al.*, 2001; Vargas-Vargas, 2017; Bodur *et al.*, 2018; El-Saber Batitha *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante establecer la dosis idónea y el tiempo máximo de exposición al eugenol para cada especie (Cho y Heath 2000; Barata y Soakes, 2016). Por ejemplo, en salmónidos se ha observado que bajas concentraciones de eugenol pueden ser tóxicas, mientras que en otras especies es un anestésico eficaz (Chacón-Guzmán *et al.*, 2019; Haro-González *et al.*, 2021).

*Dormitator latifrons* (Richardson, 1844), comúnmente llamado chame, es un pez anfídromo que se distribuye en el Pacífico centro oriental (Ruiz-González *et al.*, 2020) y constituye un importante recurso acuícola, pesquero y cultural en Ecuador. Esta especie se produce a pequeña y mediana escala, tanto en estanques de agua dulce como salobre (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2020); sin embargo, los volúmenes de producción no son constantes debido al desconocimiento biológico de

la especie. Recientemente, Vega-Villasante *et al.* (2021) señalan lagunas evidentes en el conocimiento de la especie, lo que ha ocasionado cuellos de botella en su manejo, conservación y reproducción.

*D. latifrons* tiene la capacidad de sobrevivir hasta 72 horas fuera del agua, característica que es aprovechada por los productores para su traslado, monitoreo, comercialización interna o exportación. No obstante, los estudios bajo condiciones de laboratorio deben garantizar el bienestar de los animales (Silva *et al.*, 2013) por lo que es necesario establecer protocolos de anestesia para desarrollar investigaciones en esta especie. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el tiempo de inducción y tiempo de recuperación en *D. latifrons* mantenidos en agua dulce y salobre, expuestos a diferentes dosis con eugenol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 240 individuos de chame fueron obtenidos en el humedal «La Segua» (0° 42' 34" S y 80° 11' 56" W), Ecuador. Los peces fueron transportados en cajas plásticas sin agua al laboratorio para su aclimatación. Se mantuvieron en cuarentena durante siete días en tanques circulares de 1000 L de capacidad, con fotoperiodo natural, temperatura de 23 °C, agua dulce (0 Unidades Prácticas de Salinidad – UPS) o salobre (20 UPS), pH 8.0 y 4 mg/L de oxígeno disuelto. Los peces fueron alimentados con balanceado comercial para camarón (22% de proteína y 4% de lípidos; Agripac S.A., Ecuador). Una vez pasada la cuarentena, los peces con peso  $28.58 \pm 10.52$  g fueron distribuidos en 24 tanques (12 de agua dulce y 12 de agua salobre), cada tanque con 10 animales.

El eugenol (85% de pureza en base oleosa) fue utilizado en dosis de 42.5, 85, 170 y 255 mg/L. Posteriormente, los peces fueron transferidos individualmente a un acuario con 15 L de agua dulce (0 UPS) o agua salobre

(20 UPS) con la dosis de eugenol de cada tratamiento. El acuario con la solución del anestésico se mantuvo con temperatura de 23 °C, pH 8.0 y 4 mg/L de oxígeno disuelto. En cada tratamiento se analizaron 30 peces. Se registró el tiempo de inducción calculado como el tiempo desde la exposición al fármaco hasta la pérdida de actividad muscular, así como el tiempo de recuperación calculado como el tiempo donde se observa recuperación de la posición erguida con natación normal. El tiempo de inducción y recuperación se tomó con un cronómetro digital Marathon adanac 3000.

Para la recuperación, los peces fueron colocados en un tanque de 200 L de agua dulce o salobre a temperatura de 23 °C y 4 mg/L de oxígeno disuelto. Después de la recuperación se pusieron en los tanques de 1000 L para observarlos por 7 días y calcular el porcentaje de supervivencia. Se calculó el radio entre el tiempo de recuperación y tiempo de inducción ( $Tr/Ti$ ), donde valores mayores a 1 indican que el tiempo de recuperación es más largo que el tiempo de inducción.

Los procedimientos de bioética animal de este estudio contaron con el permiso del Comité de Bioética Institucional de la Universidad Técnica de Manabí, establecido en el Tomo 021-12, folio: 21-12-1.

La normalidad y homogeneidad de las variables tiempo de inducción, tiempo de recuperación y  $Tr/Ti$  se determinaron mediante los análisis de Shapiro-Wilk y de Levene's, respectivamente. Para determinar si el tiempo de inducción y el tiempo de recuperación mostraron diferencias en función a la salinidad y la dosis de eugenol se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial. En caso de encontrar diferencia se usó el post hoc de Duncan. Para determinar si las  $Tr/Ti$  variaron significativamente entre dosis de eugenol se utilizó un análisis de varianza de una vía. Los análisis se realizaron utilizando el software Statística 7.0 (Stat Soft. Inc.) y el nivel mínimo de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

El tiempo de inducción con eugenol no mostró diferencias significativas ( $F_{(1,232)} = 3.34$ ;  $p > 0.05$ ) entre salinidades (0 y 20 UPS), en tanto que el tiempo de recuperación mostró diferencias significativas ( $F_{(1,232)} = 17.74$ ;  $p < 0.05$ ) entre salinidades, siendo mayor en agua salobre (706 s) que en agua dulce (507 s). El tiempo de inducción fue menor con el incremento de la dosis, tanto en agua dulce como agua salobre ( $F_{(3,232)} = 41.57$ ;  $p < 0.05$ ) (Cuadro 1); sin embargo, en la dosis más baja (42.5 mg/L) el tiempo de inducción en agua salobre fue significativamente menor que en agua dulce a la misma dosis (Figura 1A).

El tiempo de recuperación incrementó significativamente con el incremento de la dosis, tanto en agua dulce como salobre ( $F_{(3,232)} = 23.50$ ;  $p < 0.05$ ; Cuadro 1), sin embargo, a dosis más altas (170 y 255 mg/L) el tiempo de recuperación fue significativamente mayor en agua salobre (Figura 1B). No se observó mortalidad durante los experimentos ni durante los siete días posteriores al experimento.

El radio Ti/Tr aumentó con el incremento de la dosis de eugenol tanto en agua dulce como salada ( $F_{(3,232)} = 5.82$ ;  $p < 0.05$ ). En todas las dosis el radio fue mayor a 1; sin embargo, a una dosis de 255 mg/L se observó una diferencia significativa entre agua dulce y salobre ( $p < 0.05$ ) mostrando los valores más altos en agua salobre (Figura 2).

Cuadro 1. Efecto de la dosis de aceite de clavo (eugenol) y la salinidad del agua sobre la anestesia en el chame *Dormitator latifrons*

Dosis (mg/L)	Tiempo de inducción (s)	
	0 UPS	20 UPS
42.5	703.72 ± 77.36 <sup>a</sup>	450.31 ± 47.91 <sup>a</sup>
85	380.93 ± 58.11 <sup>b</sup>	396.59 ± 39.58 <sup>a</sup>
170	183.08 ± 28.61 <sup>b</sup>	225.23 ± 22.68 <sup>b</sup>
255	153.23 ± 18.82 <sup>c</sup>	125.13 ± 7.84 <sup>b</sup>

Dosis (mg/L)	Tiempo de recuperación (s)	
	0 UPS	20 UPS
42.5	341.07 ± 30.03 <sup>a</sup>	386.55 ± 39.66 <sup>a</sup>
85	475.24 ± 51.24 <sup>ab</sup>	484.16 ± 30.66 <sup>a</sup>
170	557.22 ± 60.78 <sup>b</sup>	852.23 ± 95.62 <sup>b</sup>
255	653.37 ± 53.08 <sup>b</sup>	1101.61 ± 119.05 <sup>b</sup>

	ANOVA bidireccional (tiempo de inducción)				
	GL	ANOVA SS	Cuadro medio	Valor F	Valor P
Salinidad	1	187656	187656	3.34	>0.069
Dosis (mg/L)	3	7001300	2333767	41.57	<0.001
Salinidad*Dosis (mg/L)	3	817795	272598	4.86	<0.002

	ANOVA bidireccional (tiempo de recuperación)				
	GL	ANOVA SS	Cuadro medio	Valor F	Valor P
Salinidad	1	2385941	2385941	17.74	<0.001
Dosis (mg/L)	3	9483437	3161146	23.50	<0.001
Salinidad*Dosis (mg/L)	3	1965559	655186	4.87	<0.003

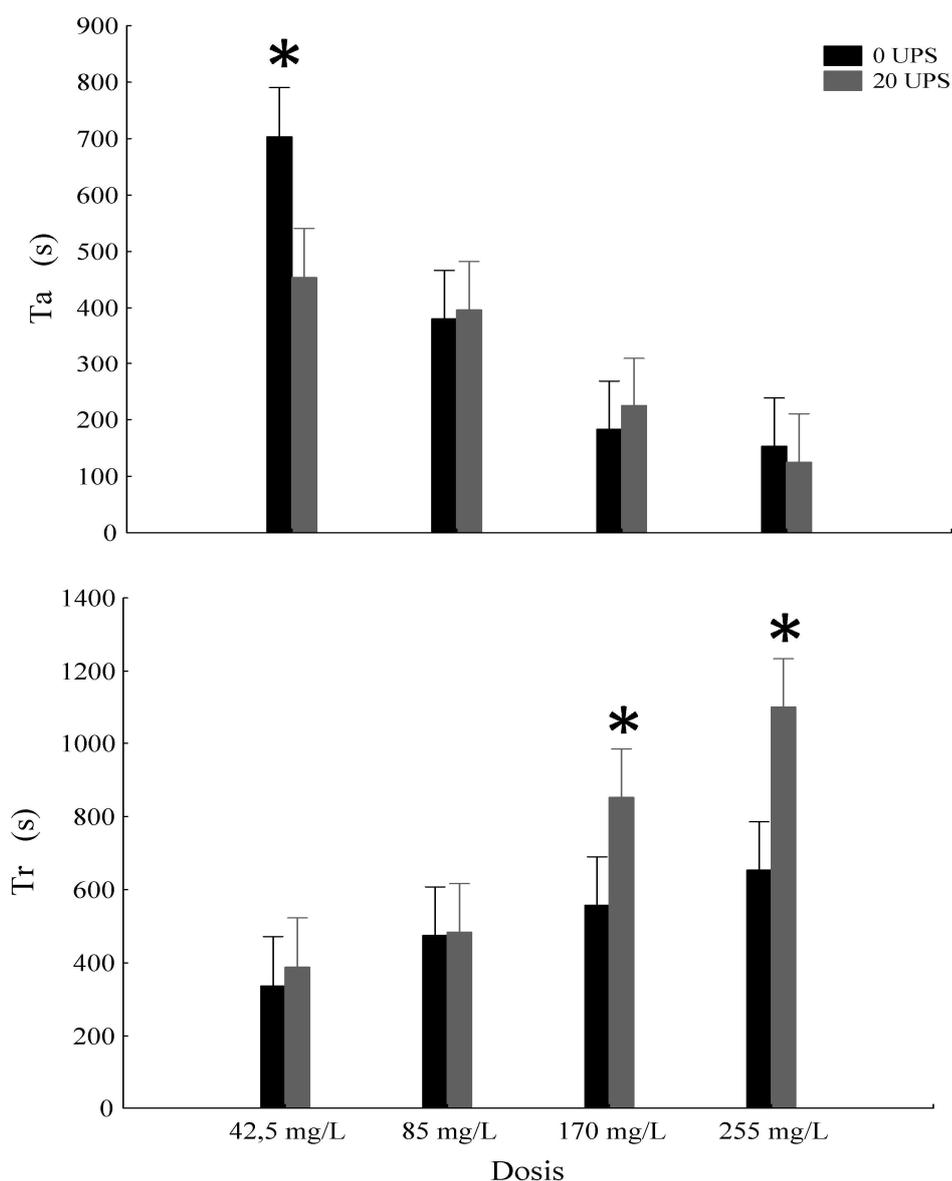


Figura 1. Tiempos de efecto de inducción (Ti) y tiempo de recuperación (Tr) en *Dormitator latifrons* anestesiados con cuatro dosis de eugenol en agua dulce y salobre. Promedios y desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas entre salinidades. s = segundos

## DISCUSIÓN

La anestesia se ha usado históricamente en acuicultura, experimentación y procedimientos veterinarios en organismos acuáticos (Sneddon, 2012); sin embargo, aun cuando *D. latifrons* es considerada una especie potencial para la acuicultura en algunos paí-

ses del Pacífico centro oriental, hasta la fecha no existen estudios que evalúen el uso de anestésicos para su manipulación en acuicultura o en investigación.

Los resultados indican que *D. latifrons* puede ser anestesiado exitosamente con eugenol en dosis menores a 255 mg/L, tanto en agua dulce como salobre, sin ocasionar

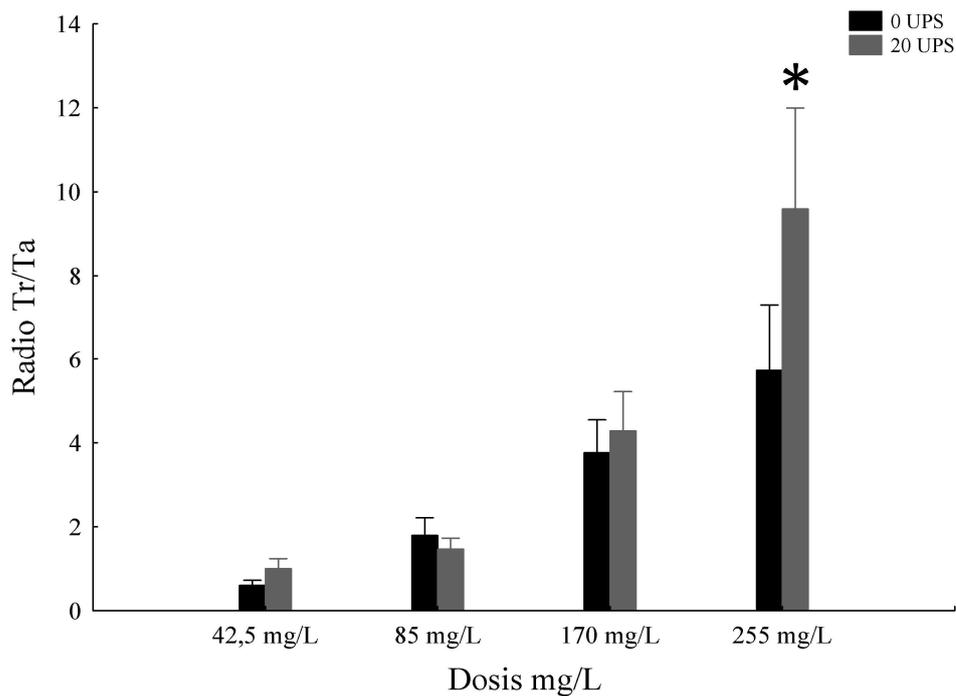


Figura 2. Radio tiempo de recuperación y tiempo de inducción (Tr/Ti) en *Dormitator latifrons* anestesiados con cuatro dosis de eugenol en agua dulce y salobre. Promedio y desviación estándar. El asterisco: indica diferencias significativas entre salinidades

mortalidad. Este resultado concuerda con otros estudios que indican las bondades del eugenol como excelente anestésico para peces (Woody *et al.*, 2002), incluyendo *Oryzias latipes*, *Carassius auratus*, *Salmo salar*, *Oreochromis* sp y *Poecilia vivipara*, entre otras (Soto y Burhanuddin, 1995; Woody *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2003; Rucinke *et al.*, 2016; Bolasina *et al.*, 2017).

Los resultados indican que, tanto en agua dulce como salobre, el incremento de la dosis de eugenol disminuye el tiempo de inducción e incrementa el tiempo de recuperación. Es decir, a mayor concentración de eugenol, el organismo absorbe una mayor cantidad de anestésico, lo que podría ocasionar un tiempo más largo de remoción del producto en el organismo e incrementaría el tiempo de recuperación. Este patrón de concen-

tración dependiente es bien conocido, tanto en peces marinos como la dorada sobaity *Sparidentex hasta* (Valenciennes, 1830) (Afkhami *et al.*, 2014); el salmón *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) (Iversen *et al.*, 2003), rutilo – *Rutilus frisii* (Nordmann, 1840) (Javahery *et al.*, 2012), bagre de dientes afilados – *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Ödretmen y Kaya, 2013), entre otros. De igual manera varios autores mencionan que este patrón se cumple para otros tipos de anestésicos como el 2-fenoxietanol, benzoína, metomidato y MS-222 (Javahery *et al.*, 2012; Afkhami *et al.*, 2014).

En la dosis más baja (42.5 mg/L) se observó una disminución significativa en el tiempo de inducción en agua salobre respecto al agua dulce, sugiriendo un efecto sinérgico entre dosis de eugenol y la química del agua.

Las concentraciones más altas, al producir una inducción más rápida (Bowker *et al.*, 2015), podrían estar menos influenciada por la química del agua, mientras que con dosis más bajas se tuvo un tiempo de inducción más largo. En este sentido, Barry *et al.* (2017) mencionan la posibilidad de que los aspectos del medio podrían influir en la solubilidad de los sedantes y causar una sedación más o menos potente dependiendo de las concentraciones del soluto. Por ejemplo, el agua dulce contiene mayor cantidad de carbonato de calcio que el agua salada y se conoce que el eugenol reacciona con el calcio formando quelato, reduciendo la acción del eugenol (González-Escobar 2002).

Existe poca información sobre los mecanismos de acción del eugenol (Stoskopf y Posner, 2008) y la influencia de la salinidad en la eficacia de este producto como sedante para peces (Barry *et al.*, 2017). En este estudio, el incremento de la salinidad produjo un aumento significativo del tiempo de recuperación en las dosis más altas (170 y 255 mg/L), lo que podría estar relacionado con la capacidad eurihalina de *D. latifrons* con preferencia de ambientes dulceacuícolas (Nordlie y Haney 1993).

En especies marinas o anádromas como la lubina (macho de lubina rayada *Morone saxatilis* x hembra de lubina blanca *M. chrysops*) sedadas con AQUIS 20E, se han reportado tiempos de recuperación menores en salinidades de 15 a 25 g/L respecto a salinidades de 0 a 15 g/L (Barry *et al.*, 2017). En el caso de especies eurihalinas, como *D. latifrons*, que tienen la capacidad de tolerar agua dulce y salada, los mecanismos de sedación son desconocidos; sin embargo, es posible que exista una relación entre el punto isoosmótico y la solubilidad del anestésico. Asimismo, se debe considerar que el chame es una especie sedentaria o poco ágil (Guadamud y Vera, 2009), y se ha descrito que una tasa metabólica mayor puede redu-

cir el tiempo de recuperación al facilitar el metabolismo y excreción del anestésico (Javahery *et al.*, 2012).

En todas las dosis el radio Ti/Tr fue mayor a 1, lo que significa que el tiempo de inducción fue más corto que el tiempo de recuperación. Se indica que un anestésico es eficaz cuando se tiene una sedación en un periodo menor o igual a 3 min y un tiempo de recuperación (nado normal) a los 15 min (Woody *et al.*, 2002; Ghazilou *et al.*, 2010). De acuerdo con esta definición, la dosis eficaz de eugenol para *D. latifrons* fue de 170 mg/L, siendo el tiempo de inducción de 3 min y tiempo de recuperación de 9 min en agua dulce, mientras que en agua a 20 UPS el tiempo de anestesiado fue ligeramente mayor a 3 min y un tiempo de recuperación de 14 min.

## CONCLUSIONES

- El eugenol mostró ser un anestésico eficaz y seguro que puede ser usado para estudios de laboratorio de *D. latifrons*.
- La dosis eficaz de eugenol para *D. latifrons* fue de 170 mg/L; sin embargo, para procedimientos de corta duración se podría utilizar una inmersión en una dosis de 42.5 mg/L para lograr una sedación ligera o de rápida recuperación.
- El incremento de la dosis de eugenol disminuyó el tiempo de inducción e incrementó el tiempo de recuperación, tanto en agua dulce como salada.

## Agradecimientos

A la Universidad Técnica de Manabí por el apoyo económico al proyecto «Aspectos biológicos del chame *Dormitator latifrons* en ambientes naturales y de producción». Al Centro de Sanidad Acuícola del Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables.

## LITERATURA CITADA

1. **Afkhami M, Ahmadi MR, Salarzadeh A, Ehsanpour M. 2014.** Comparative efficacy of two anesthetic agents in the Sobaity sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes 1830). *Comp Clin Path* 23: 841-846. doi: 10.1007/s00580-013-1699-3
2. **Aydín B, Barbas LAL. 2020.** Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: a review. *Aquaculture* 520: 734999. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.734999
3. **Barata M, Soakes F. 2016.** Efficiency of 2-phenoxyethanol and clove oil for reducing handling stress in reared meagre, *Argyrosomus regius* (Pisces/ : Sciaenidae). *J World Aquacult Soc* 47: 82-92. doi: 10.1111/jwas.12245
4. **Barry KJ, Trushenski JT, Bowker JD. 2017.** Salinity has limited influence on sedation of sunshine bass with AQUI-S 20E (10% Eugenol). *N Am J Aquacult* 29: 155-162. doi: 10.1080/15222055.2016.1259702
5. **Bodur T, Afonso JM, 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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.09.029
6. **Bolasina SN, Azevedo A De, Petry AC. 2017.** Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. *Aquac Rep* 6: 56-60. doi: 10.1016/j.aqrep.2017.04.002
7. **Bowker JD, Trushenski JT, Glover DC, Carty DG, Wandelaar N. 2015.** Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. *Rev Fish Biol Fish* 25: 147-163. doi: 10.1007/s11160-014-9374-6
8. **Caudill CC, Jepson MA, Lee SR, Dick TL, George NP, Keefer ML. 2014.** A field test of eugenol-based anesthesia versus fish restraint in migrating adult chinook salmon and steelhead. *T Am Fish Soc* 143: 856-863. doi: 10.1080/0002-8487.2014.892533
9. **Chacón-Guzmán J, Carvajal-Oses M, Pauletto S, Herrera-Ulloa Á. 2019.** Concentración y tiempo máximo de exposición de juveniles de pargo manchado *Lutjanus guttatus* al eugenol *Syzygium aromaticum* concentration and maximum exposure time of *Lutjanus guttatus* juveniles to *Syzygium aromaticum* eugenol. *Rev Cienc Mar Costeras* 11: 9-25. doi: 10.15359/revmar.11-1.1
10. **Cho GK, Heath DD. 2000.** Comparison of tricaine methanesulfonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac Res* 31: 537-546. doi: 10.1046/j.1365-2109.2000.00478.x
11. **Christiansen HE, Gee LP, Mesa MG. 2013.** Anesthesia of juvenile Pacific lampreys with MS-222, BENZOAK, AQUI-S 20E, and Aquacalm. *N Am J Fish Manage* 33: 269-276. doi: 10.1080/02755947.2012.754807
12. **El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, Wasef L, Elewa YHA, Al-Sagan A, Abd El-Hack ME, Taha AE, et al. 2020.** Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L): a review. *Nutrients* 12: 872. doi: 10.3390/nu12030872
13. **Fernandes IM, Bastos YF, Barreto DS, Lourenço LS, Penha JM. 2017.** A eficiência do óleo de cravo como anestésico e em procedimentos de eutanásia em peixes de pequeno porte. *Braz J Biol* 77: 444-450. doi: 10.1590/1519-6984-15015
14. **Ghazilou A, Hasankandi HS, Chenary F, Nateghi A, Haghi N, Sahraeean MR. 2010.** The anesthetic efficiency of clove oil in caspian salmon, *Salmo trutta caspius* k, smolts in dosage – salinity – pH. *J world Aquacult Soc* 41: 655-660. doi: 10.1136/bmj.c3852

15. **González-Escobar R. 2002.** Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cuban Estomatol* 39(2).
16. **Gonzalez-Martinez A, Lopez M, Molero HM, Rodriguez J, González M, Barba C, García A. 2020.** Morphometric and meristic characterization of native chame fish (*Dormitator latifrons*) in Ecuador using multivariate analysis. *Animals*. 10: 16. doi: 10.3390/ani10101805
17. **Guadamud T, Vera J. 2009.** Crecimiento de juveniles del pez «Chame» (*Dormitator latifrons* Richardson, 1844) alimentados con dietas de diferentes niveles de proteína. Tesis de Licenciado en acuicultura: Ecuador: Univ. Técnica de Manabí. 104 p.
18. **Haro-González JN, Castillo-Herrera GA, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H. 2021.** Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* l. myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules* 26: 6387. doi: 10.3390/molecules26216387
19. **Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA. 2003.** The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221: 549-566. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00111-X
20. **Javahery S, Nekoubin H, Moradlu AH. 2012.** Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiol Biochem* 38: 1545-1552. doi: 10.1007/s10695-012-9682-5
21. **Kamble AD, Saini VP, Ojha ML. 2014.** The efficacy of clove oil as anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*) and its potential metabolism reducing capacity. *Int J Fauna Biol Stud* 1: 1-6.
22. **Manuel R, Boerrigter J, Roques J, Van der Heul J, Van der Bos R, Flik G, Van de Vis H. 2014.** Stress in African catfish (*Clarias gariepinus*) following overland transportation. *Fish Physiol Biochem* 40: 33-44. doi: 10.1007/S10695-013-9821-7
23. **Nordlie FG, Haney DC. 1993.** Euryhaline adaptations in the fat sleeper *Dormitator maculatus*. *J Fish Biol* 43: 433-439. doi: 10.1111/j.1095-8649.1993.tb00578.x
24. **Ödretmen F, Kaya G. 2013.** comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile african catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Turk J Fish Aquat Sc* 56: 51-56. doi: 10.4194/1303-2712-v13
25. **Rucinque DS, Polo G, Borbón J, González JF. 2016.** Anesthetic use of eugenol and benzocaine in juveniles of red (*Oreochromis* sp). *Rev Colomb Cienc Pec* 30: 60-66. doi: 10.17533/udea.rccp.v30n1a07
26. **Ruiz-González LE, Vega-Villasante F, Tintos-Gómez A, Del Rio-Zaragoza OB, Hernández-Rodríguez M, Barragán MP, Badillo-Zapata D. 2020.** Some hematology and blood chemistry parameters of the pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844). *Lat Am J Aquat Res* 48: 131-135. doi: 10.3856/vol48-issue1-fulltext-2343
27. **Silbernagel C, Yochem P. 2016.** Effectiveness of the anesthetic AQUI-S® 20E in marine finfish and elasmobranchs. *J Wildlife Dis* 52: S96-S103. doi: 10.7589/52.2S.S96
28. **Silva LL, da Silva DT, Garlet QI, Cunha MA, Mallmann CA, Baldissarotto B, Longhi SJ, et al. 2013.** Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotrop Ichthyol* 11: 443-451. doi: 10.1590/S1679-62252013000200014
29. **Sindhu MC, Ramachandran A. 2013.** Acute toxicity and optimal dose of clove oil as anaesthetic for blue hill trout *Barilius bakeri* (day). *Fish Technol* 50: 280-283.
30. **Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA. 2001.** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am J Vet Res* 62: 337-342. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.337

31. **Sneddon LU. 2012.** Clinical anesthesia and analgesia in fish. *J Exot Pet Med* 21: 32-43. doi: 10.1053/j.jepm.2011.-11.009
32. **Soto CG, Burhanuddin. 1995.** Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 136: 149-152. doi: 10.1016/0044-8486(95)01051-3
33. **Stoskopf M, Posner LP. 2008.** Anesthesia and restraint of laboratory Fish. In: *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2<sup>nd</sup> ed.. Academic Press. p 519-534.
34. **Tacchi L, Lowrey L, Musharrafieh R, Crossey K, Larragoite ET, Salinas I. 2015.** Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 435: 120. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2014.09.027
35. **Trushenski JT, Bowker JD, Cooke SJ, Erdahl D, Bell T, MacMillan JR, Yanong RP, et al. 2012.** Issues regarding the use of sedatives in fisheries and the need for immediate-release options. *Am Fish S S* 142: 156-170. doi: 10.1080/00028487.2012.732651
36. **Vargas-Vargas R. 2017.** Pez cebrá (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anest México* 29: 86-96.
37. **Vega-Villasante F, Ruiz-González LE, Chong-Carrillo O, Basto-Rosales MER, Palma-Cancino DJ, Tintos-Gómez A, Montoya-Martínez CE, et al. 2021.** Biology and use of the pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844): state of the art review. *Lat Am J Aquat Res* 49: 391-403. doi: 10.3856/vol49-issue3-fulltext-2637
38. **Woody CA, Nelson J, Ramstad K. 2002.** Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: Field trials. *J Fish Biol* 60: 340-347. doi: 10.1006/jfbi.2001.1842