

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS  
NOS TRÓPICOS

ANESTESIA E TRANSPORTE DE *Colossoma macropomum* COM  
OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* E  
*Mentha piperita*

FRANMIR RODRIGUES BRANDÃO

MANAUS – AM

2020

FRANMIR RODRIGUES BRANDÃO

ANESTESIA E TRANSPORTE DE *Colossoma macropomum* COM  
OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* E  
*Mentha piperita*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Pesqueiras, área de concentração Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas

Coorientadora: Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

MANAUS-AM

2020

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Brandão, Franmir Rodrigues  
B821t Anestesia e transporte de *Colossoma macropomum* com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* / Franmir Rodrigues Brandão . 2020  
124 f.: 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas  
Coorientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan  
Tese (Doutorado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. manejo. 2. anestésico natural . 3. fisiologia . 4. enzima. 5. acetilcolinesterase. I. Chagas, Edsandra Campos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

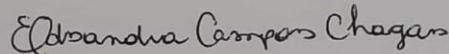
## FRANMIR RODRIGUES BRANDÃO

### **Anestesia e transporte de *Colossoma macropomum* com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita***

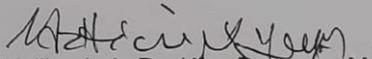
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Aprovado em 28 de FEVEREIRO de 2020.

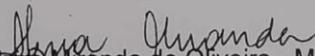
#### BANCA EXAMINADORA



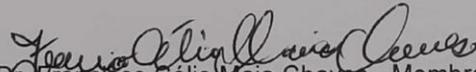
Dr<sup>a</sup> Edsandra Campos Chagas - Presidente  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



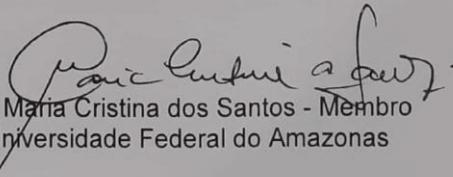
Dr. Wallace Luiz Paxiúba Duncan - Membro  
Universidade Federal do Amazonas



Dr<sup>a</sup> Azira Miranda de Oliveira - Membro  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia



Dr. Francisco Célio Maia Chaves - Membro  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Dr<sup>a</sup> Maria Cristina dos Santos - Membro  
Universidade Federal do Amazonas

## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai Francisco, minha mãe Maria do Perpétuo Socorro (Dona Peta), aos meus irmãos Patrícia e Rodrigo, aos meus sobrinhos amados Luís Henrique, Yasmin e João, aos meus avós Mario e Maria Izabel, Leonilda e Jeco. E aos meus tios Luiza e Lázaro (in memória).*

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra Edsandra Campos Chagas pela orientação, suporte e amizade ao longo de todas as etapas deste trabalho;

À Dra. Fernanda Almeida O`Sullivan pela coorientação, por ter aceitado a contribuir para minha formação acadêmica.

Aos meus familiares pelo apoio, prece e compreensão nas ausências das comemorações em família;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio logístico para a realização dos estudos.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação;

Às coordenadoras do Programa de Pós-graduação, professoras Kedma Yamamoto e Flávia Souza do Programa Ciências Pesqueiras nos Trópicos (CIPET) pela constante busca de melhorias no curso;

Aos Professores do Curso Ciências Pesqueiras nos Trópicos (CIPET) que através dos seus ensinamentos pude aprimorar os meus conhecimentos e hoje estar concluindo mais esse ciclo;

Aos colegas de turma PPGCIPET/2015-2, pelo apoio e companheirismo nesses 4 anos de labuta entre disciplinas e experimentos;

À banca de qualificação do doutorado, Dr. Wallice Paxiúba Duncan, Dra. Maria Cristina dos Santos, Dra. Gabriela Tomás Gerônimo, Dra. Márcia Machado e Dr. Francisco Célio Maia Chaves pelas valiosas recomendações ao trabalho;

Aos meus amigos da equipe de Sanidade de espécies aquícolas, em especial à Maria Inês Braga de Oliveira, Caio Santana Farias, Damy Caroline de Melo Souza, Jony Velask e Maria Juliete de Souza Rocha pela colaboração e trabalho em equipe;

Às técnicas do laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Iraní Moraes e Cláudia Majolo, pelo suporte técnico nas análises laboratoriais;

Aos funcionários do setor de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, Sr. Edson Paiva Afonso e Sr. José Marconde da Costa e Silva, pelo suporte nas atividades de campo;

Ao Dr. Francisco Celio Maio Chaves, responsável pelo setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio e dedicação à pesquisa, que incansavelmente contribui para as nossas pesquisas, desde o plantio das mudas até a colheita dos materiais vegetais utilizados em nossos estudos.

Ao Dr. Marcelo Róseo de Oliveira, analista do laboratório Plantas Medicinais e fitoquímica da Embrapa Amazônia Ocidental, pela contribuição na extração dos óleos essenciais, que foram a base deste estudo.

Ao Dr. Wallice Paxiúba Duncan, do laboratório de Morfologia funcional da Universidade Federal do Amazonas, pelo suporte nas análises bioquímicas e enzimáticas;

Às mestres Lorena Vieira de Matos e Maria Inês Braga de Oliveira, do laboratório de Histologia Funcional da Universidade Federal do Amazonas, pelo suporte no processamento de amostras e análises histopatológicas;

À Fundação de Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo, que é de suma importância para o andamento da pesquisa no nosso estado.

À Deus por tudo que alcançamos.

**AGRADEÇO!**

*“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”*

*Carl Jung*

## RESUMO GERAL

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie nativa mais produzida no Brasil. No entanto, em função da grande demanda, o aumento nas densidades de estocagem nos ambientes de criação, além das inúmeras práticas de manejo que conduzidas de forma inadequadas tem acarretado efeitos deletérios para o plantel. Com o intuito de minimizar esses efeitos, inúmeros produtos comerciais vêm sendo utilizados na aquicultura para reduzir os efeitos do estresse. Na última década muitos estudos descrevem a necessidade de avaliar produtos alternativos provenientes de espécies vegetais, que possuem propriedades anestésicas, em especial os que visam a redução do estresse associado ao transporte dos peixes. Com isso, o objetivo do trabalho foi em uma primeira etapa, a realização de uma revisão de literatura visando descrever o potencial anestésico e redutor de estresse dos óleos essenciais em peixes nativos, com especial ênfase para *C. macropomum*. Na sequência, a partir de delineamentos experimentais implantados no campo experimental da Embrapa na Amazônia ocidental, óleos essenciais de três fontes vegetais - *Aloysia triphylla* (OEAT), *Lippia sidoides* (OELS) e *Mentha piperita* (OEMP) - foram avaliados visando a determinação dos tempos e das concentrações necessárias para indução e recuperação anestésica em tambaqui e a avaliação das respostas morfofisiológicas do estresse em função do transporte sob a influência dos óleos essenciais. Para o alcance desses objetivos, as plantas foram cultivadas no setor de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, sendo os óleos essenciais extraídos e caracterizados quimicamente por espectrofotometria de massas e cromatografia em fase gasosa. Os peixes – juvenis de *C. macropomum* - foram adquiridos em estação de piscicultura comercial do município de Rio Preto da Eva - AM e transportados para o campo experimental da Embrapa em Manaus, onde passaram pela fase de recria até alcançarem o tamanho desejado para realização dos experimentos. No primeiro ensaio, para determinação do tempo e da concentração necessária dos óleos essenciais para indução e recuperação anestésica, os peixes foram individualmente expostos a diferentes concentrações dos óleos essenciais (OEAT: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 150 mg L<sup>-1</sup>; OELS: 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>; OEMP: 5, 10, 20, 40, 60, 70 e 90 mg L<sup>-1</sup>), num período entre quatro minutos a seis horas de exposição. Os três óleos essenciais apresentaram propriedades anestésicas. Os intervalos de concentração em que os peixes alcançaram todos os estágios de anestesia

(1, 2, 3a, 3b, 4) foram entre 40 a 150 mg L<sup>-1</sup> para OEAT, 20 a 50 mg L<sup>-1</sup> para OELS e 40 a 90 mg L<sup>-1</sup> para OEMP. A exposição de *C. macropomum* às concentrações anestésicas dos óleos não foi associada ao aumento à ocorrência de danos irreversíveis nas lamelas branquiais. No segundo ensaio, os óleos essenciais de *L. sidoides* e *M. piperita* foram avaliados como redutores de estresse no transporte de *C. macropomum*. Os peixes (127,55 ± 22,41 g) foram transportados durante quatro horas em sacos plásticos, compondo os seguintes tratamentos: a) controle não estressado (NE - não submetido ao transporte), b) controle estressado (E - submetido ao transporte), c) OELS 10 mg L<sup>-1</sup>, d) OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, e) OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> e f) OEMP 40 mg L<sup>-1</sup>, com três repetições. Após o transporte foram analisados parâmetros de qualidade de água, hormonais, bioquímicos e enzimáticos. *C. macropomum* transportado com OELS 20 mg L<sup>-1</sup> apresentou uma redução significativa nos níveis de cortisol se comparado aos peixes transportados sem óleo essencial. A via glicolítica foi especialmente estimulada nos peixes transportados com OEMP 20 mg L<sup>-1</sup>, pois os valores das enzimas glicolíticas hexoquinase (HK), piruvato cinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) estavam elevados no tecido muscular. Os óleos essenciais não afetaram a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro de *C. macropomum*, e após o transporte os peixes de todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa (28,2%) da AChE muscular. As concentrações OELS 20 mg L<sup>-1</sup> e OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> promoveram aumento dos níveis da enzima glutationa S-transferase (GST) no cérebro. Conclui-se que os óleos essenciais nas concentrações avaliadas tendem a melhorar a qualidade da água durante o transporte, minimizam o estresse fisiológico, ajudam a manter a demanda energética por meio da via glicolítica e, além disso, não demonstram ter efeitos neurotóxicos, é recomendado a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> OELS para uso no transporte de *C. macropomum*. Diante dos resultados apresentados, as perspectivas se abrem para a avaliação de compostos isolados dos óleos essenciais, assim como nanomoléculas com o intuito de aumentar a eficácia dos óleos essenciais e potencializar as suas atividades biológicas, a exemplo das atividades anestésicas e redutoras de estresse. Com a disponibilização destas informações pretende-se contribuir para desenvolvimento do setor produtivo, levando maior biossegurança e biossegurança no segmento da aquicultura.

Palavras-chave: manejo, anestésico natural, fisiologia, enzima, acetilcolinesterase

## ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most produced native species in Brazil. However, due to the great demand, the increase in stocking densities in breeding environments, in addition to the innumerable management practices that have been carried out inappropriately, have caused deleterious effects for the breeding stock. In order to minimize these effects, numerous commercial products have been used in aquaculture to reduce the effects of stress. In the last decade, many studies have described the need to evaluate alternative products from plant species, which have anesthetic properties, especially those aimed at reducing the stress associated with fish transport. Thus, the objective of the work was, in a first step, to carry out a literature review in order to describe the anesthetic and stress-reducing potential of essential oils in native fish, with special emphasis on *C. macropomum*. Following, from experimental designs implanted in Embrapa Amazônia Ocidental experimental field, essential oils from three vegetable sources - *Aloysia triphylla* (EOAT), *Lippia sidoides* (EOLS) and *Mentha piperita* (EOMP) - were evaluated in order to determine the time and concentrations necessary for anesthetic induction and recovery in tambaqui and the evaluation of morphophysiological responses to stress due to transport under the influence of essential oils. To achieve these goals, the plants were grown in the medicinal plant sector of Embrapa Amazônia Ocidental, with essential oils extracted and chemically characterized by mass spectrophotometry and gas chromatography. The fish - juveniles of *C. macropomum* - were purchased at a commercial fish farming station in the municipality of Rio Preto da Eva - AM and transported to the Embrapa experimental field in Manaus, where they passed through the breeding phase until they reached the desired size for the fish experiments. In the first test, to determine the time and the necessary concentration of essential oils for anesthetic induction and recovery, the fish were individually exposed to different concentrations of essential oils (EOAT: 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 150 mg L<sup>-1</sup>; EOLS: 2, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 mg L<sup>-1</sup>; EOMP: 5, 10, 20, 40, 60, 70 and 90 mg L<sup>-1</sup>), in a period between four minutes at six hours of exposure. The three essential oils showed anesthetic properties. The concentration intervals at which the fish reached all stages of anesthesia were (1, 2, 3a, 3b, 4) were between 40 to 150 mg L<sup>-1</sup> for EOAT, 20 to 50 mg L<sup>-1</sup> for EOLS and 40 to 90 mg L<sup>-1</sup> for EOMP. The exposure of *C. macropomum* to anesthetic concentrations of oils was not associated with an increase in the occurrence of irreversible damage to the gill lamellae.

In the second trial, the essential oils of *L. sidoides* and *M. piperita* were evaluated as stress reducers in the transport of *C. macropomum*. The fish ( $127.55 \pm 22.41$  g) were transported for four hours in plastic bags, comprising the following treatments: a) non-stressed control (NS - not subjected to transport), b) stressed control (S - subjected to transport), c) EOLS  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , d) EOLS  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , e) EOMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$  and f) EOMP  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , with three repetitions. After transport, water quality, hormonal, biochemical and enzymatic parameters were analyzed. *C. macropomum* transported with EOLS  $20 \text{ mg L}^{-1}$  showed a significant reduction in cortisol levels when compared to fish transported without essential oil. The glycolytic pathway was especially stimulated in fish transported with EOMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , since the values of glycolytic enzymes hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were elevated in muscle tissue. The essential oils did not affect the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the brain of *C. macropomum*, and after transport, fish from all treatments showed a significant reduction (28.2%) in muscle AChE. The EOLS  $20 \text{ mg L}^{-1}$  and EOMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$  concentrations increased the levels of the glutathione S-transferase (GST) enzyme in the brain. It is concluded that essential oils in the concentrations evaluated tend to improve water quality during transport, minimize physiological stress, help maintain energy demand through the glycogen pathway and, in addition, do not demonstrate neurotoxic effects, recommended to concentration of  $20 \text{ mg L}^{-1}$  EOLS for use in the transport of *C. macropomum*. Given the results presented, the perspectives open up for the evaluation of compounds isolated from essential oils, as well as nanomolecules in order to increase the effectiveness of essential oils and enhance their biological activities, such as anesthetic and stress-reducing activities. With the provision of this information, it is intended to contribute to the development of the productive sector, leading to greater biosecurity and biosafety in the aquaculture segment.

**Key words:** management, natural anesthetic, physiology, enzyme, acetylcholinesterase

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b>	Espécie de <i>Aloysia triphylla</i> cultivada em Manaus-AM.	46
<b>Figura 2</b>	Espécie de <i>Lippia alba</i> cultivada em Manaus-AM.	48
<b>Figura 3</b>	Espécie de <i>Lippia sidoides</i> cultivada em Manaus-AM.	50
<b>Figura 4</b>	Espécie de <i>Mentha piperita</i> cultivada em Manaus-AM.	52
<b>Figura 5</b>	Espécie de <i>Ocimum gratissium</i> cultivada em Manaus-AM.	53

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b>	Indução e recuperação anestésica de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ), com emprego de diferentes concentrações dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> (A), <i>Lippia sidoides</i> (B) e <i>Mentha piperita</i> (C).	101
<b>Figura 2</b>	Alterações histológicas mais frequentes em brânquias de <i>Colossoma macropomum</i> após indução anestésica com os óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> . A – Hiperplasia do epitélio lamelar (cabeça de seta); B – Fusão lamelar (seta); C – Proliferação de células de cloreto (c); D – Hipertrofia do epitélio lamelar (asteriscos) e proliferação das células de cloreto (c).	103
<b>Figura 3</b>	Valores médios do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) em brânquias de <i>Colossoma macropomum</i> , após indução anestésica com óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> .	104

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b>	<p>Parâmetros bioquímicos de <i>Collossoma macropomum</i> após transporte com os óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i>. A – cortisol, glicose e lactato plasmáticos, B – glicogênio hepático e muscular. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o transporte. Asteriscos indica diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey (P&lt;0,05). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de <i>L. sidoides</i> 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de <i>L. sidoides</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de <i>M. piperita</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de <i>M. piperita</i> 40 mg L<sup>-1</sup>.</p>	116
<b>Figura 2</b>	<p>Amônia plasmática de <i>Collossoma macropomum</i> após transporte com os óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i>. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o transporte. Asteriscos indica diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey (P&lt;0,05). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de <i>L. sidoides</i> 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de <i>L. sidoides</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de <i>M. piperita</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de <i>M. piperita</i> 40 mg L<sup>-1</sup>.</p>	117
	<p>Parâmetros enzimáticos de <i>Collossoma macropomum</i> após transporte com os óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i>. A – LDH, HK e PK no músculo, B – AchE e GST no cérebro e músculo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os</p>	

<p><b>Figura 3</b></p>	<p>tratamentos, após o transporte. Asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey (<math>P &lt; 0,05</math>). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de <i>L. sidoides</i> 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de <i>L. sidoides</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de <i>M. piperita</i> 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de <i>M. piperita</i> 40 mg L<sup>-1</sup>. LDH - Lactato Desidrogenase, HK - Hexoquinase e PK - Piruvato quinase.</p>	<p>118</p>
------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1</b>	Estágios de anestesia em peixes, segundo Schoettger & Julin (1969).	35
<b>Tabela 2</b>	Principais espécies de plantas utilizadas como anestésicos em peixes nativos e os principais compostos químicos presentes em seu óleo essencial.	36
<b>Tabela 3</b>	Atividade anestésica dos óleos essenciais para peixes nativos.	39
<b>Tabela 4</b>	Atividade anestésica dos óleos essenciais para <i>Colossoma macropomum</i> .	42
<b>Tabela 5</b>	Uso de óleos essenciais no transporte de peixes nativos.	44
<b>Tabela 6</b>	Transporte de <i>Colossoma macropomum</i> com uso de óleos essenciais	45
<b>Tabela 7</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> nas condições de Manaus - AM	46
<b>Tabela 8</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> nas condições de Manaus-AM.	48
<b>Tabela 9</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> nas condições de Manaus-AM.	50
<b>Tabela 10</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> condições de Manaus-AM.	52
<b>Tabela 11</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Ocimum gratissimum</i> condições de Manaus-AM.	53

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b>	Componentes majoritários dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> e <i>Aloysia triphylla</i> .	97
<b>Tabela 2</b>	Tempo necessário para atingir os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> em juvenis de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> .	98
<b>Tabela 3</b>	Tempo necessário para atingir os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> em juvenis de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> .	99
<b>Tabela 4</b>	Tempo necessário para atingir os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> em juvenis de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> .	100
<b>Tabela 5</b>	Frequência relativa (%) dos danos histopatológicos em brânquias de <i>Colossoma macropomum</i> , após indução anestésica com óleo essencial de <i>Aloysia triphylla</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> .	102
<b>Tabela 6</b>	Frequência relativa (%) do índice de alteração histopatológica (IAH) observado em brânquias de <i>Colossoma macropomum</i> , após indução anestésica com óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> .	105

## CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b>	Componentes majoritários dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i>	114
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros de qualidade água antes e após o transporte (4 h) de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) com adição dos óleos de essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> .	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ACTH	Hormônio corticotropina
ACHE	Acetilcolinesterase
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CAT	Catálise
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GPx	Glutationa peroxidase
HHI	Hipotálamo-pituitária-interrenal
SNS	Sistema nervoso simpático
HPI	Hipotálamo-hipófise-interrenal
HSP	Proteínas de choque térmica
HK	Hexokinase
IR	Índice de retenção
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDH	Lactato Desidrogenase
MS-222	Tricaína metanosulfonato
OEAT	Óleo essencial de <i>Aloysia triphilla</i>
OELS	Óleo essencial de <i>Lipia sidoides</i>

OEMP	Óleo essencial <i>Mentha piperita</i>
PK	Piruvato quinase
PEIXE BR	Anuário Brasileiro de Piscicultura
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>Capítulo I</b> .....	29
<b>Óleos essenciais como anestésico e redutor de estresse em peixes nativos do Brasil: especial ênfase para <i>Colossoma macropomum</i></b> .....	29
<b>1. Introdução</b> .....	33
<b>2. Estresse em peixes</b> .....	34
<b>3. Anestesia de peixes</b> .....	37
<b>4. Plantas utilizadas como anestésicos em peixes nativos</b> .....	38
<b>5. Anestesia de peixes com emprego de óleos essenciais</b> .....	41
5.1. Peixes nativos.....	41
5.2. <i>Colossoma macropomum</i> .....	44
<b>6. Transporte de peixes com emprego de óleos essenciais</b> .....	45
6.1. Peixes nativos.....	45
6.2. <i>Colossoma macropomum</i> .....	47
<b>7. Perspectivas para estudos com óleos essenciais em <i>Colossoma macropomum</i></b> ....	48
7.1. <i>Aloysia triphylla</i> .....	48
7.2. <i>Lippia alba</i> .....	51
7.3. <i>Lippia sidoides</i> .....	52
7.4. <i>Mentha piperita</i> .....	54
7.5. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	56
<b>8. Conclusão</b> .....	57
<b>Agradecimentos</b> .....	57
<b>Divulgação</b> .....	58
<b>Referências</b> .....	58
<b>Capítulo II</b> .....	69
<b>Potencial anestésico dos óleos essenciais de <i>Aloysia triphylla</i>, <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> para <i>Colossoma macropomum</i></b> .....	70
<b>1. Introdução</b> .....	72
<b>2. Material e Métodos</b> .....	73
2.1. Plantas, extração e caracterização química dos óleos essenciais .....	73
2.2. Animais.....	73
2.3. Indução anestésica e recuperação.....	74
2.4. Análise histopatológica.....	75
2.5. Análise estatística.....	75

<b>3. Resultados</b> .....	75
<b>4. Discussão</b> .....	76
<b>Conclusão</b> .....	80
<b>Agradecimentos</b> .....	80
<b>Referências</b> .....	80
<b>Capítulo III</b> .....	95
<b>Óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> e <i>Mentha piperita</i> como redutores de estresse no transporte de <i>Collossoma macropomum</i></b> .....	96
<b>1. Introdução</b> .....	99
<b>2. Material e métodos</b> .....	100
2.1. Obtenção das plantas, extração e caracterização química dos óleos essenciais .....	100
2.2. Procedimento experimental .....	100
2.3. Análise dos parâmetros de qualidade de água.....	101
2.4. Coleta sanguínea e análises.....	101
2.5. Análise de cortisol.....	101
2.6. Análises bioquímicas.....	102
2.7. Análises enzimáticas .....	102
2.7.1. Hexoquinase (HK).....	102
2.7.2. Piruvato quinase (PK).....	103
2.7.3. Lactato desidrogenase (LDH) .....	103
2.7.4. Glutathione S-transferase (GST).....	103
2.7.5. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	103
2.8. Análises estatísticas .....	104
<b>3. Resultados</b> .....	104
3.1. Parâmetros de qualidade de água .....	104
3.2. Parâmetros hormonais e bioquímicos.....	104
3.3. Parâmetros enzimáticos .....	105
<b>4. Discussão</b> .....	106
4.1. Parâmetros de qualidade de água .....	106
4.2. Parâmetros hormonais e bioquímicos.....	106
4.3. Parâmetros enzimáticos .....	108
<b>5. Conclusão</b> .....	109
<b>Agradecimentos</b> .....	109
<b>Referências</b> .....	110

## INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura à nível mundial continua em pleno desenvolvimento, muito embora nos últimos anos (2001-2016) a sua taxa de crescimento anual tenha ficado em 5,8%, mas ainda assim a aquicultura é o setor que apresenta maior crescimento em relação aos outros setores de produção de alimentos. É importante destacar que a produção aquícola mundial em 2016 foi de 110,2 milhões de toneladas, e que deste total 54,1 milhões de toneladas foram de peixes, configurando mais uma vez como o grupo mais produzido (FAO, 2018).

Para a aquicultura brasileira o cenário não é tão diferente, pois no ano de 2016 a maior receita de produção, cerca de R\$ 4,61 bilhões (70,9%), foi de peixes, seguida pela produção de camarões, que alcançou 19,3% (IBGE, 2016). Ao longo dos anos esta atividade vem se expandindo e se consolidando no Brasil; segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR) no ano de 2019 o Brasil produziu um total de 758.006 toneladas de peixes, registrando um crescimento de 4,9% em relação ao ano anterior. As tilápias (*Oreochromis* sp.) continuaram em primeiro lugar com produção de 432.149 toneladas e na segunda colocação os peixes nativos com 287.930 toneladas (PEIXE BR, 2020). Embora os peixes nativos estejam presentes em quase todo o país, em 2018 sua produção caiu para 39,84% em decorrência de problemas climáticos, sanitários e mercadológicos (PEIXE BR, 2018).

Entre as espécies nativas mais cultivadas destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), com 102,6 mil toneladas produzidas no Brasil no ano de 2018. Embora esta espécie seja criada em outras regiões, cerca de 73,1% do total de tambaqui produzido no ano de 2018 foi oriundo de estados da região Norte (IBGE, 2018). Os motivos pelos quais o tambaqui vem se mantendo a frente de outras espécies nativas consiste em seu excelente potencial para produção intensiva, na facilidade de obtenção de juvenis, por apresentar bom crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido, e principalmente devido a disponibilização de tecnologias para a sua criação (GOMES et al., 2010; IZEL et al., 2013, 2018; SAINT-PAUL, 2017; VALLADÃO et al., 2018).

Devido ao aumento da produção e comercialização de peixes, entre as práticas de manejo que mais cresceram nos últimos anos está o transporte de peixes vivos (PIPER et al., 1982; TONDOLO et al., 2013; SALBEGO et al., 2014; BECKER et al.,

2016). Este procedimento envolve várias etapas como captura, confinamento, manuseio, adensamento e o transporte propriamente dito, e se não conduzido de forma adequada pode induzir respostas de estresse (primária, secundária e terciária), culminando, entre outras implicações, em consequências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes a patógenos (BRANDÃO et al., 2006; GOMES et al., 2006; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017; VALLADÃO et al., 2018). Assim, para minimizar o efeito do estresse oriundo das práticas de manejo, mediante atenuação da ativação do eixo hipófise-hipotálamo-inter-renal (HHI), o uso de anestésicos é uma das técnicas empregadas (PURBOSARI et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020).

Os anestésicos utilizados em peixes são classificados quanto a sua origem em produtos sintéticos ou naturais. Entre os anestésicos sintéticos mais utilizados estão a triclaína metanosulfonato (MS-222), benzocaína, 2-fenoxietanol, quinaldina e propofol (BOLASINA et al., 2017; PURBOSARI et al., 2019; SOUZA et al., 2019; UEHARA et al., 2019). Entretanto, alguns desses anestésicos sintéticos apresentam alto custo de aquisição, pequena margem de segurança, alterações em parâmetros fisiológicos dos peixes como depressão da função cardiovascular e respiratória, aumento do lactato, níveis elevados de catecolaminas e inibição da síntese de cortisol, além dos resíduos em peixes, humanos e no ambiente (CARTER et al., 2011; ZAHL et al., 2012; PURBOSARI et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020). Portanto, o estudo de anestésicos naturais se faz necessário para desenvolver produtos anestésicos que apresentem eficácia em baixa concentração e com rápida recuperação, redução das respostas de estresse e mortalidade dos peixes, além de apresentar baixos níveis de resíduos e um baixo custo.

Nos últimos anos têm sido crescentes os estudos com produtos extraídos de plantas como os óleos essenciais, extratos vegetais ou seus compostos isolados quanto à sua atividade anestésica, em diferentes espécies de peixes (BOIJINK et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018; BATISTA et al., 2018; SOUZA et al., 2019). Com relação aos óleos essenciais, bons resultados têm sido apresentados para espécies da família Verbenaceae como *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lippia sidoides* e *Aloysia triphylla* (CUNHA et al., 2010; GRESSLER et al., 2014; TONI et al., 2014; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; SILVA et al., 2019), da família Lamiaceae como *Ocimum gratissimum*, *Mentha piperita* e *Mentha arvensis* (SILVA et al., 2012; PEDRAZZANI & OSTRENSKY NETO, 2016; BOIJINK et al., 2016; SPANGHERO et al., 2019), entre outros. Assim, considerando os fatos anteriormente

mencionados sobre as características anestésicas desejáveis e em função da falta de informações sobre o uso destes óleos essenciais em peixes da Amazônia, como o tambaqui, as plantas *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* foram selecionadas para este estudo, destacando-se o fato destas plantas possuírem em suas composições componentes com atividades anestésicas descritas.

Essa **Tese** é composta por uma Introdução Geral e por três capítulos:

O **Capítulo I** é uma revisão de literatura que apresenta o potencial anestésico e redutor de estresse dos óleos essenciais em peixes nativos, com especial ênfase para *Colossoma macropomum*.

O **Capítulo II** teve como objetivo avaliar o potencial anestésico dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com base no comportamento de natação dos peixes e possíveis danos histopatológicos nas brânquias.

O **Capítulo III** teve como objetivo avaliar o uso dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* como redutor de estresse no transporte de *Colossoma macropomum*, com base nas respostas hormonais, bioquímicas, hematológicas e enzimáticas.

## REFERÊNCIAS

AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish. **Aquaculture**, v. 520, e734999, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>

BALDISSEROTTO, B. et al. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. **Neotropical Ichthyology**, v. 16(1), e1701281, 2018. <http://dx.doi.org/DOI: 10.1590/1982-0224-20170128>

BATISTA, E. S. et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, v. 495, p. 545–549, 2018.

BECKER, A. G. et al. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 73–81, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-015-0118-x> . Acesso em 22 de nov. 2019.

BOIJINK, C. L. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24–28, 2016.

BOLASINA, S. N.; 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, 2017.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.

CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 51–59, 2011.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 431-406, 2010.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018 Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

GOMES, L. C. et al. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2 ed. Santa Maria: UFSM, p. 175-204, 2010.

GRESSLER, L. T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research** v. 45, p. 1061-1072, 2014.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da pecuária municipal, 2016, Rio de Janeiro, 43, p. 1- 49.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal, 2018, Rio de Janeiro, [s.n.]. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>.

IZEL, A. C. U. et al. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental. Circular técnica, 39, Manaus, 4 p. 2013.

IZEL, A. C. U. et al. Cultivo do tambaqui no Amazonas, 2ª edição revista e atualizada. 2ª. ed. Brasília: Embrapa, p. 59. 2018.

PEDRAZZANI, A. S.; OSTRENSKY NETO, A. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 769–776, 2016.

PEIXE BR - Anuário Brasileiro de piscicultura, 2018. <https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>. Acesso em 20 de nov. 2019.

PEIXE BR - Anuário Brasileiro de piscicultura, 2020 <https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>. Acesso em 15 de fev. 2020.

PIPER, G. R. et al. Fish hatchery management. Washington, DC: United States Department of the Interior. p. 517, 1982.

PURBOSARI, N. et al. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A

review. **Aquaculture and Fisheries**, v.4, p. 129-133, 2019.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, p. 1–9, 2017.

SALBEGO, J. et al. The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, p. 811-818, 2014.

SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L., anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in Silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.

SILVA, H. N. P. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae) hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 128-134, 2018.

SILVA, H. N. P. et al. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural**, v. 49:6, e20181059, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20181059>

SOUZA, A. S. L. et al. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: Implications on cardiorespiratory responses. **Aquaculture**, v. 500, p. 160-169, 2019.

SOUZA, C. D. F. et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 44, p. 21-34, 2018.

SPANGHERO, D. B. N. et al. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00367, 2019. [http://dx.doi.org/ DOI: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00367](http://dx.doi.org/DOI:10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00367)

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**. v. 41, p. 913–918, 2017.

TONDOLO, J. S. M. et al. Anesthesia and transport of fast snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 667-674, 2013.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 701-714, 2014.

UEHARA, S. A. et al. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. **Aquaculture**, v. 502, p. 326-331, 2019.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 351-369, 2018.

ZAHL, I. H; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 201–218, 2012.

## **Capítulo I**

**Óleos essenciais como anestésico e redutor de estresse em peixes nativos do Brasil: especial ênfase para *Colossoma macropomum***

Artigo elaborado conforme normas do periódico Scientia Amazonia. ISSN  
(eletrônico): 2238-191

# Óleos essenciais como anestésico e redutor de estresse em peixes nativos do Brasil: especial ênfase para *Colossoma macropomum*

Franmir Rodrigues Brandão<sup>1</sup>, Damy Caroline de Melo Souza<sup>1</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>2</sup>,  
Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan<sup>1,2</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>1,2</sup>

## Resumo

Diversas práticas de rotina na aquicultura como adensamento, manuseio para biometria e transporte são consideradas potenciais estressores que estimulam os eixos hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) e hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), podendo causar alterações fisiológicas que comprometem o bem-estar e a sobrevivência dos animais. Na aquicultura, os estudos de produtos anestésicos à base de plantas têm se tornado uma tendência em todo mundo, principalmente pela potencialidade de usos, variedade de espécies e a comprovação das atividades anestésicas, antioxidantes e antimicrobianas de seus óleos essenciais. No Brasil, o uso de óleos essenciais na piscicultura para anestesia e transporte de peixes tem sido explorado, principalmente para espécies nativas como *Colossoma macropomum*, *Brycon amazonicus* e *Rhamdia quelen*. Estudos comprovam que alguns óleos essenciais possuem efeitos anestésicos, porém apresentam ação neurotóxica, mostrando que apesar da excelente atividade biológica dos compostos majoritários dos óleos ou da sinergia entre os compostos, é necessária a investigação dos efeitos adversos que podem causar e o estabelecimento da dosagem adequada para uso. Esse artigo apresenta informações sobre o uso dos óleos essenciais como anestésicos e redutores de estresse em espécies nativas cultivadas no Brasil, com ênfase no uso destes óleos para *C. macropomum*. Dentre as 28 espécies estudadas, *Lippia alba*, *Curcuma longa* e *Myrcia sylvatica* são as que já possuem uma dosagem estabelecida para anestesia e transporte de *C. macropomum*. As principais plantas selecionadas para novos estudos com *C. macropomum*, em razão do seu potencial de anestesia e redutor de estresse são *Aloysia triphylla*, *L. alba*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita* e *Ocimum gratissimum*. O estabelecimento de protocolos para o uso de óleos essenciais durante o manejo de *C. macropomum*, principalmente em operações de transporte, é de extrema importância para atividade, uma vez que são poucas as espécies de plantas que já apresentam uma ação anestésica e redutora de estresse comprovada.

**Palavras-Chave:** anestesia, estresse em peixes, plantas, transporte de peixes

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brasil, E-mails: franmirbrandao@hotmail.com, damycaroline.96@gmail.com

<sup>2</sup> Embrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brasil, E-mails: celio.chaves@embrapa.br, fernanda.almeida@embrapa.br e **edsandra.chagas@embrapa.br (autor para correspondência)**

## **Essential oils as anesthetic and stress-reducer in native Brazilian fish: special emphasis on *Colossoma macropomum***

Several routine aquaculture practices such as densification, handling for biometrics and transport are considered potential stressors that stimulate the hypothalamic-sympathetic nervous system-chromaffins cells (SNS) and hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axes, which can cause physiological changes that compromise the animal welfare and survival. In aquaculture, studies of anesthetic products based on plants have become a trend worldwide, mainly due to the potential uses, variety of species and the proof of the anesthetic, antioxidant and antimicrobial activities of their essential oils. In Brazil, the use of essential oils in fish farming for anesthesia and fish transport has been explored, mainly for native species such as *Colossoma macropomum*, *Brycon amazonicus* and *Rhamdia quelen*. Studies prove that some essential oils have anesthetic effects, but have neurotoxic action, showing that despite the excellent biological activity of the major compounds of the oils or the synergy between the compounds, it is necessary to investigate the adverse effects that they can cause and establish the appropriate dosage for use. This article presents information on the use of essential oils as anesthetics and stress reducers in native species farmed in Brazil, with an emphasis on the use of these oils for *C. macropomum*. Among the 28 species studied, *Lippia alba*, *Curcuma longa* and *Myrcia sylvatica* are those that already have an established dosage for anesthesia and transport of *C. macropomum*. The main plants selected for further studies with *C. macropomum*, due to their potential for anesthesia and stress-reducing activity are *Aloysia triphylla*, *L. alba*, *Lippia menosides*, *Mentha piperita* and *Ocimum gratissimum*. The establishment of protocols for the use of essential oils during the management of *C. macropomum*, especially in transport operations, is extremely important for activity, since there are few species of plants that already have an anesthetic and stress-reducing action comproved.

**Key words:** anesthesia, fish stress, plants, fish transport

## 1. Introdução

A aquicultura mundial continua em pleno desenvolvimento, e ainda é considerada o setor que apresenta maior crescimento em relação aos outros setores de produção de alimentos. A produção aquícola mundial foi de 110,2 milhões de toneladas em 2016, e deste total 54,1 milhões de toneladas foram de peixes, configurando mais uma vez como o grupo mais produzido (FAO, 2018). No Brasil o cenário não é tão diferente, com relação à produção de peixes atingiu-se 758.006 toneladas no ano de 2019, e as tilápias (*Oreochromis* sp.) continuaram em primeiro lugar com produção de 432.149 toneladas e na segunda colocação os peixes nativos com 287.930 toneladas (PEIXE BR, 2020).

Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, *Colossoma macropomum*, conhecido comumente como tambaqui e nativo dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes, é a espécie nativa mais cultivada com produção de 102,6 mil toneladas no ano de 2018 (GOMES et al., 2010; IBGE, 2018; VALLADÃO et al., 2018). A criação desta espécie está registrada em quase todas as regiões brasileiras, entretanto a região Norte se destaca com cerca de 73,1% do total de tambaqui produzido no ano de 2018 (IBGE, 2018). O destaque do tambaqui na aquicultura brasileira se deve ao excelente potencial para produção intensiva como a facilidade de obtenção de juvenis, aceitação de ração, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido, pobre qualidade de água e manuseio, assim como por alcançar bom crescimento, alta produtividade e boa aceitação pelo mercado consumidor (GOMES et al., 2010; IZEL et al., 2013, 2018; SAINT-PAUL, 2017; VALLADÃO et al., 2018). Quando criado em sistemas intensivos, o tambaqui pode alcançar até 2,62 kg e produção de 18.530 kg/ha após 10 meses de engorda em tanques escavados com emprego de aeradores (IZEL et al., 2013).

Com o aumento da produção e comercialização de peixes no Brasil, o transporte de peixes vivos é uma prática indispensável para a operacionalização da atividade, seja na comercialização de alevinos e juvenis, ou ainda durante a estocagem dos animais vivos nos tanques de depuração da indústria, em preparação para o abate e o processamento (VANDERZWALMEN et al., 2019). No transporte de peixes são empregadas diversas práticas como a captura, confinamento, manuseio antes do transporte, adensamento dos peixes, alterações na qualidade da água, entre outros fatores que podem induzir respostas de estresse com reflexos sobre o desempenho produtivo e a resistência dos peixes a doenças (BRANDÃO et al., 2006; SAMPAIO e FREIRE, 2016; VALLADÃO et al., 2016; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017; VANDERZWALMEN et al., 2019). Neste contexto, o uso de anestésicos em sistemas de criação tornou-se uma prática importante para o sucesso da aquicultura, visando favorecer o bem-estar dos animais durante e após as práticas de manejo, como o transporte de peixes (BARBAS et al., 2017; BIANCHINI et al., 2017; PARK et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; HOSEINI et al., 2019).

Na piscicultura são empregados anestésicos de origem sintética ou naturais (PURBOSARI et al., 2019). Entretanto, estudos mostram que alguns anestésicos sintéticos apresentam alto custo de aquisição, pequena margem de segurança, alterações em parâmetros fisiológicos dos peixes como

depressão da função cardiovascular e respiratória, aumento do lactato, níveis elevados de catecolaminas e inibição da síntese de cortisol, além dos resíduos em peixes, humanos e no ambiente (CARTER et al., 2011; ZAHL et al., 2012; PURBOSARI et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020). Nesse contexto, nos últimos anos os estudos com anestésicos naturais têm crescido significativamente, e os produtos extraídos de plantas como os óleos essenciais, extratos vegetais ou seus compostos isolados tem sido avaliados em diferentes espécies de peixes (BOIJINK et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018; BATISTA et al., 2018; SOUZA et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020), a fim de selecionar moléculas com eficácia em baixa concentração e com rápida recuperação, redução das respostas fisiológicas de estresse e mortalidade dos peixes, que apresentem baixos níveis de resíduos e um baixo custo. Portanto, nesta revisão serão apresentadas informações atualizadas sobre o uso de óleos essenciais como anestésicos e redutor de estresse em peixes nativos cultivados no Brasil, com especial ênfase para o tambaqui, espécie de grande importância na piscicultura brasileira

## **2. Estresse em peixes**

O estresse pode ser definido como a resposta fisiológica de um organismo a uma ameaça, iniciada quase imediatamente após a percepção do agente estressor, sendo essencial para a manutenção da homeostase e sobrevivência do indivíduo (SCHRECK & TORT, 2016). Segundo PICKERING (1981), as respostas ao estresse podem ser classificadas como primárias, secundárias e terciárias. As respostas primárias incluem a liberação de catecolaminas e corticosteroides como produtos da ativação dos eixos hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) e hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), respectivamente (WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas secundárias são as mudanças fisiológicas que são desencadeadas pelas liberações dos hormônios da resposta primária, tais como, o aumento da pressão sanguínea, frequência respiratória, mobilização das reservas energéticas e alterações no balanço osmótico (BALASCH & TORT, 2019). As respostas terciárias podem incluir alterações na taxa de crescimento, imunossupressão e mudanças comportamentais, e são observadas quando o animal está sob uma repetitiva ou longa exposição ao agente estressor (BALASCH & TORT, 2019).

Em sistemas de criação intensiva os peixes são expostos ao confinamento em altas densidades, além de práticas de transporte e manuseio periódico, que são consideradas como potentes agentes estressores (COSTA et al., 2019). Assim, para uma melhor compreensão de como tais agentes estressores podem influenciar o estado de saúde e bem-estar dos peixes em cultivo, estão sendo continuamente selecionados indicadores de estresse para avaliar o estado fisiológico desses animais. Os indicadores podem incluir a medição de produtos diretos do estímulo do eixo HPI (ex. cortisol plasmático), assim como das respostas secundárias como níveis de glicose plasmática, lactato, glicogênio, triglicerídeos, proteínas totais, osmolaridade, alterações em parâmetros hematológicos ou em nível celular, pela avaliação de enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico (HSP) e transaminases (SOPINKA et al., 2016).

As catecolaminas liberadas pelo estímulo do eixo HSC elevam o número de eritrócitos circulantes e também os valores de hematócrito devido ao aumento do número das hemácias, sendo a contração do baço o principal mecanismo pelo qual essas mudanças são efetuadas (WENDELAAR BONGA, 1997). Em estudo com *Prochilodus nigricans* (curimatá) exposto a situação de hipóxia, os peixes apresentaram aumento nos valores de hematócrito e na contração de hemoglobina (VAL et al., 2015). Por outro lado, espécimes de *C. macropomum* expostos a diferentes densidades de estocagem não apresentaram alteração nos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina ou contagem de eritrócitos (COSTA et al., 2019). Assim, os parâmetros hematológicos podem indicar a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue do animal e quanto determinada situação estressora pode demandar ou não por alterações nesses parâmetros, podendo levar a homeostase ou a um estado doentio (SOPINKA et al., 2016).

O cortisol é o principal corticosteroide em peixes, responsável pela resposta glicocorticoide e mineralocorticoide. Este hormônio atua, principalmente, sobre brânquias, fígado e intestino, resultando na mobilização de reservas energéticas e em alterações do balanço osmorregulatório (PANKHURST, 2011). Em comparação com a imediata liberação de catecolaminas ante um agente estressor, o aumento dos níveis de cortisol plasmático é um pouco mais tardio. Mediante uma situação estressora, o hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado na corrente sanguínea (BARTON, 2002). Quando o ACTH atinge as células interrenais, estimula estas células a produzirem e secretarem os corticosteroides na corrente sanguínea, por onde alcançarão os tecidos-alvos.

A ação dos corticosteroides, principalmente do cortisol em peixes, sobre o metabolismo energético culmina na elevação dos níveis da glicose plasmática, a fim de suprir a demanda energética do peixe estressado (KIILERICH et al., 2018). Diversos estudos mostram o efeito estimulante do cortisol sobre enzimas glicolíticas como glicose-6-fosfatase (G6P) e piruvatoquinase (PK), que resulta no aumento da demanda por glicose, induzindo a glicogenólise

(FAUGHT; VIJAYAN, 2016). Por outro lado, diversos estudos mostram o efeito estimulante do cortisol sobre enzimas glicolíticas como glicose-6-fosfatase (G6P) e piruvato-quinase (PK), que resulta no aumento da demanda por glicose, induzindo a glicogenólise (FAUGHT; VIJAYAN, 2016). O cortisol também estimula a gliconeogênese a partir da alanina, sendo produzidos piruvato e glutamato pelo processo de transaminação realizada pela enzima alanina aminotransferase (ALT) e, por fim, a utilização de piruvato para a gliconeogênese (SILVEIRA et al., 2009). Além disso, o cortisol pode diminuir a atividade de enzimas como a lactato desidrogenase (LDH), inibindo a capacidade anaeróbica do animal, direcionando o uso de vias aeróbicas para produção de energia (TRIPATHI e VERMA, 2003).

Com o aumento da atividade metabólica, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio e ácido hipoclorídrico, é um resultado natural também observado. As ROS danificam a estrutura de outras moléculas biológicas como lipídeos, proteínas, RNA e DNA, causando danos a membrana celular, inativação de enzimas, alterações no DNA, podendo culminar na morte celular (BABICH; PALACE; STERN, 1993). Porém, as ROS são naturalmente mantidas a baixos níveis na célula devido a existência de mecanismos de defesa antioxidantes que incluem enzimas como **peróxido dismutase (POD)**, catalase, vitaminas C e E e o sistema redutor da glutatona (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). O desequilíbrio entre as EROs e as defesas antioxidantes, estando a primeira em níveis mais elevados, caracteriza o estresse oxidativo (LESSER, 2006).

Assim, situações estressoras resultam em um intenso gasto energético que se reflete em alterações hormonais, bioquímicas e hematológicas, que podem levar à redução da eficiência na conversão alimentar, do crescimento, mudanças comportamentais e, em última instância, comprometer a sobrevivência do animal (HUNTINGFORD e KADRI, 2014). Tendo conhecimento disto, a aplicação de novas práticas de manejo e a abordagem de substâncias que poderiam minimizar o estresse causado por estas práticas durante o cultivo tem sido cada vez mais utilizada. A utilização de substâncias naturais ou sintéticas para redução do estresse, assim como de fármacos para a eliminação de patógenos, pode ser tóxico aos peixes pela dificuldade de eliminação da substância utilizada ou por causar alterações fisiológicas irreversíveis, gerando mudanças comportamentais ou, em maiores níveis de intoxicação, levar a morte dos animais (PRATTE-SANTOS e CARRIELO, 2009; DIAS et al., 2018; SPANGHERO et al., 2019).

Dentre os marcadores para avaliar a toxicidade das substâncias empregadas no manejo dos peixes, os níveis de acetilcolinesterase (AChE) tem sido amplamente utilizado como indicador de neurotoxicidade, uma vez que algumas substâncias podem inibir a ação desta enzima (BENOVIT et al., 2015; BIANCHINI et al., 2017). A acetilcolinesterase é a enzima

responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) e, portanto, controlar o estímulo muscular. Quando acetilcolinesterase é inibida, o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica pode causar estímulo excessivo da fibra muscular, resultando em natação errática, comprometimento da alimentação e da reprodução (RAO et al., 2005). Portanto, substâncias que tenham um efeito inibitório significativo sobre a acetilcolinesterase devem ser evitadas ou utilizadas com mais cautela (FAO, 2007).

Neste sentido, o emprego de medidas mitigadoras de estresse durante a criação dos peixes, garantindo o bem-estar animal, segurança ambiental e o próprio aumento da produção são primordiais, e dentre essas boas práticas de manejo o próprio processo de anestesia durante as operações de rotina na piscicultura deve ser melhor explorado para o sucesso da atividade (FERREIRA e BARCELLOS, 2008).

### **3. Anestesia de peixes**

Os anestésicos têm sido amplamente utilizados no manejo de peixes para prevenir lesões corporais, facilitar o manuseio dos peixes em operações de rotina na piscicultura como biometrias, transporte, amostragem para diagnósticos de doenças, entre outras, garantindo assim o bem-estar dos animais (ROSS e ROSS, 2008; PURBOSARI et al., 2019). Os anestésicos devem apresentar uma rápida ação depressora sobre o sistema nervoso central (SNC), ou seja, devem possuir a capacidade de bloquear ou reduzir a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) nos peixes, quando estes são expostos à condições estressantes, permitindo assim a atenuação das respostas de estresse (ROSS & ROSS, 2008).

A anestesia envolve vários componentes que incluem sedação, imobilização, inconsciência, amnésia (perda de memória) e analgesia (alívio da dor) (Z AHL et al., 2012). Os anestésicos são utilizados em diversas práticas de rotina na piscicultura para redução do metabolismo dos peixes, e consequente diminuição do consumo de oxigênio, produção de CO<sub>2</sub> e elevados níveis de amônia, permitindo assim o uso de maiores densidades de estocagem para a transferência dos peixes de forma mais eficiente (SAMPAIO e FREIRE, 2016). De forma geral, a anestesia em peixes para operações de rotina em piscicultura ocorre via inalação, realizada por meio de banhos de imersão, sendo o anestésico absorvido pelas brânquias (Z AHL et al., 2012). Entretanto, em alguns casos específicos, como em peixes de grande porte e de respiração aérea obrigatória, a técnica de anestesia empregada consiste na aspersão branquial dos anestésicos (HONCZARYK e INOUE, 2009; 2010).

Os protocolos de indução anestésica em peixes descrevem diversos estágios, estabelecidos de acordo com as alterações comportamentais, como mudanças no padrão de natação, frequência respiratória e reações a estímulos externos (SCHOETTGER e JULIN, 1969; WOODY et al., 2002; SMALL, 2003; Z AHL et al., 2012). Na Tabela 1 apresentamos a classificação dos estágios de anestesia, segundo

Schoettger e Julin (1969). Destaca-se que o anestésico ideal deve produzir anestesia rápida (1 a 5 minutos) e recuperação rápida (< 10 minutos) dos peixes, além de ser barato, prático de usar, solúvel em água e não deixar resíduos em peixes, humanos ou no meio ambiente (PARK et al., 2017; BOLASINA et al., 2017; PURBOSARI et al., 2019).

**Tabela 1.** Estágios de anestesia em peixes, segundo Schoettger e Julin (1967).

Estágio	Descrição	Características
1	Sedação leve	Perda parcial da reação aos estímulos externos
2	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, sem nenhuma reação aos estímulos externos
3a	Perda total do equilíbrio	Perda de equilíbrio, mas mantêm a habilidade de natação
3b	Perda total do equilíbrio	Habilidade de natação perdida, mas responde à pressão no pedúnculo caudal
4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, sem nenhuma reação aos estímulos externos
5	Colapso medular	Cessa o movimento respiratório e o peixe morre

Os anestésicos utilizados em peixes são classificados quanto a sua origem em produtos sintéticos ou naturais. Quanto aos anestésicos sintéticos, os mais utilizados em peixes são a triclaína metanosulfonato (MS-222), benzocaína, 2-fenoxietanol, quinaldina e propofol (BOLASINA et al., 2017; PURBOSARI et al., 2019; SOUZA et al., 2019; UEHARA et al., 2019). Entretanto, devido principalmente a fatores como impacto ambiental, resíduos em peixes e humanos, e alto custo de aquisição, os anestésicos sintéticos têm sido preteridos em relação aos anestésicos naturais (PURBOSARI et al., 2019).

#### 4. Plantas utilizadas como anestésicos em peixes nativos

Para os peixes nativos, cultivados no Brasil, vários estudos têm sido realizados avaliando o emprego de óleos essenciais de plantas bioativas como anestésicos e redutores de estresse, com destaque para espécies como *C. macropomum*, *Brycon amazonicus* (matrinxã), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum* (tambacu), *Serrasalmus rhombeus* (piranha preta), *Rhamdia quelen* (jundiá), entre outras (RIBEIRO et al., 2016; SENA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018; SOUZA et al., 2019; SPANGHERO et al., 2019; VENTURA et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020). Isto se dá em razão dos componentes dos óleos essenciais de algumas plantas apresentarem características sedativas e/ou anestésicas, que podem ser decorrentes de seus compostos majoritários e/ou da sinergia entre seus compostos químicos (BATISTA et al., 2018; SOUZA et al., 2019; SPANGHERO et al., 2019).

Neste sentido, as principais espécies de plantas estudadas, quanto à eficácia sedativa e anestésica em peixes nativos, pertencem às famílias Verbenaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Poaceae, Rutaceae,

Myrtaceae, Piperaceae e Zingiberaceae, sendo as composições químicas dos óleos essenciais destas plantas apresentadas na Tabela 2. Destaca-se que a variação na composição química dos óleos essenciais para uma mesma espécie de planta se explica por vários fatores que incluem origem geográfica, condições climáticas, sazonalidade, estágio de desenvolvimento das plantas, procedimentos adotados para processamento e extração do óleo essencial e o próprio quimiotipo das plantas (MARCIAL et al., 2016). Assim, para o desenvolvimento de bioprodutos com características anestésicas um dos pontos primordiais é a qualidade da matéria prima, e nesse sentido SOUZA et al. (2019) recomendam o cultivo de plantas que apresentem homogeneidade genética, de modo que se obtenha consistência na composição química de seus óleos essenciais, e conseqüentemente o efeito desejado.

**Tabela 2.** Principais espécies de plantas utilizadas como anestésicos em peixes nativos e os principais compostos químicos presentes em seu óleo essencial.

<b>Plantas</b>	<b>Família</b>	<b>Constituintes químicos</b>	<b>Referências</b>
<i>Aloysia gratissima</i>	Verbenaceae	1,8- cineol, sabineno, guaiol, biciclogermacreno	BENOVIT et al. (2015)
<i>Aloysia polystachya</i>	Verbenaceae	carvona, $\alpha$ -limoneno	FOGLIARINI et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	Verbenaceae	$\alpha$ -citral, $\beta$ -citral, limoneno	SANTOS et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	Verbenaceae	geranial, limoneno, <i>cis</i> -carveol, óxido de cariofileno	ALMEIDA et al. (2018)
<i>Aniba rosaeodora</i>	Lauraceae	linalol	BALDISSEROTTO et al. (2018)
<i>Aniba parviflora</i>	Lauraceae	linalol	BALDISSEROTTO et al. (2018)
<i>Citrus x aurantium</i>	Rutaceae	limoneno, linalol e $\beta$ -pineno	LOPES et al. (2018)
<i>Citrus x latifolia</i>	Rutaceae	limoneno, $\gamma$ -terpineno, $\alpha$ -citral, $\beta$ -citral, $\beta$ -pineno	LOPES et al. (2018)
<i>Cunila galioides</i>	Lauraceae	linalol, $\delta$ -cadinol, valenceno	CUNHA et al. (2017)
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	$\beta$ -felandreno, $\alpha$ -terpinoleno, 1,8-cineol	SACCOL et al. (2017)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Poaceae	geranial, neral	LIMMA-NETTO et al. (2016)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Poaceae	$\alpha$ -citral, $\beta$ -citral, 6-metil-5-heptene-one	SANTOS et al. (2017)
<i>Cymbopogon nardus</i>	Poaceae	geraniol, citronelol, acetato de geranil	BARBAS et al. (2017a)
<i>Hesperozygis ringens</i>	Lamiaceae	pulegona	SILVA et al. (2013a)
<i>Hyptis mutabilis</i>	Lamiaceae	globulol, germacreno D	SILVA et al. (2013b)
<i>Lippia alba</i>	Verbenaceae	<i>E</i> -citral, <i>Z</i> -citral, limoneno	SOUZA et al. (2017a)

<i>Lippia alba</i>	Verbenaceae	$\beta$ -linalol, 1,8-cineol, $\gamma$ -muuroleno	SOUZA et al. (2017a)
<i>Lippia alba</i>	Verbenaceae	linalol, eucaliptol, aromadendreno	ALMEIDA et al. (2018)
<i>Lippia sidoides</i>	Verbenaceae	timol, $\rho$ -cimeno, $\beta$ -cariofileno	SILVA et al. (2013a)
<i>Lippia sidoides</i>	Verbenaceae	carvacrol, $\rho$ -cimeno, $\beta$ -cariofileno	SILVA et al. (2013a)
<i>Lippia organoides</i>	Verbenaceae	carvacrol, timol, $\rho$ -cimeno	BECKER et al. (2018)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	terpineno-4-ol, $\gamma$ -terpineno, $\alpha$ -terpineno	SOUZA et al. (2018a)
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	mentol, mentofurano, pulegona, acetato de mentila, mentona, limoneno e 1,8-cineol	SPANGHERO et al. (2019)
<i>Myrcia sylvatica</i>	Myrtaceae	$\beta$ -selineno, cadaleno, $\alpha$ -calacoreno, Z-calameno	SACCOL et al. (2017a)
<i>Myrcia sylvatica</i>	Myrtaceae	ar-curcumeno, 1- <i>epi</i> -cubenol, $\beta$ -selineno, cadaleno, $\alpha$ -calacoreno, Z-calameneno	SACCOL et al. (2018)
<i>Nectandra grandiflora</i>	Lauraceae	deidrofuquinona	BARBAS et al. (2017b)
<i>Nepeta cataria</i>	Lamiaceae	nepetalactona, dihidronepetalactona, $\beta$ -cariofileno	SOUZA et al. (2019)
<i>Ocimum americanum</i>	Lamiaceae	$\beta$ -linalol, cânfora, eugenol, 1,8-cineol	SILVA et al. (2015a)
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	linalol	LIMMA-NETTO et al. (2016)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	eugenol, Z- $\beta$ -ocimeno, germacreno D, $\beta$ -cariofileno	BANDEIRA Jr. et al. (2017)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	eugenol, 1,8-cineol	RIBEIRO et al. (2016)
<i>Ocimum micranthum</i>	Lamiaceae	estragol (metil chavicol), linalol	ZEPPEFELD et al. (2019)
<i>Ocotea acutifolia</i>	Lauraceae	óxido de cariofileno, epóxido calareno, $\tau$ -elemeno	SILVA et al. (2013a)
<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae	terpineno-4-ol, cis-terpineno, cis-terpineol, 2-careno, sabineno	CUNHA et al. (2017)
<i>Piper divaricatum</i>	Piperaceae	metil eugenol, acetato de eugenila, eugenol	VILHENA et al. (2019)

## 5. Anestesia de peixes com emprego de óleos essenciais

### 5.1. Peixes nativos

Entre as espécies de peixes nativos, *R. quelen* é a mais estudada quanto ao emprego de produtos naturais como os óleos essenciais e extratos vegetais quanto as suas propriedades anestésicas e redutor de estresse (PARODI et al., 2012; BENOVIĆ et al., 2015; SANTOS et al., 2017; LOPES et al., 2018; SPANGHERO et al., 2019). Dentre os óleos essenciais avaliados, os estudos concentram-se, em sua grande maioria, na avaliação do óleo de *L. alba* dos quimiotipos citral e linalol (SOUZA et al., 2017a; 2018b; BECKER et al., 2018).

Sedação e anestesia de *R. quelen* com o óleo de *L. alba*, quimiotipos citral e linalol, foi alcançada com o emprego das concentrações de 100 e 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Quanto às respostas fisiológicas, o equilíbrio eletrolítico não foi alterado, houve redução do cortisol plasmático (exceto em 100  $\mu\text{L L}^{-1}$ , quimiotipo linalol), aumento dos níveis de glicose (exceto em 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , quimiotipo linalol) e creatina (300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , quimiotipo citral), mas a maioria dos parâmetros retornou aos valores basais após 10 minutos de recuperação (SOUZA et al., 2017a). Em operações de manuseio, o emprego do óleo de *L. alba*, quimiotipos citral e linalol, não evitou alterações no metabolismo energético (altos níveis de superóxido dismutase, catalase e glutatona S-transferase), mas a anestesia com o quimiotipo linalol não causou danos aos lipídios ou proteínas com observado com o quimiotipo citral, cujo aumento nos níveis de carbonilização proteica no rim e fígado é indicativo de danos renais e hepáticos (SOUZA et al., 2018b). Com base nos efeitos fisiológicos observados, os autores recomendam o uso do óleo de *L. alba* quimiotipo linalol para a anestesia de *R. quelen* (SOUZA et al., 2017a; 2018b).

Outras espécies de *Lippia* avaliadas para *R. quelen* como a *L. origanoides*, que tem como composto majoritário do seu óleo o carvacrol (47,2%), também apresentou efeito anestésico (200-300  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Este óleo é recomendado para uso em operações de transporte, por contribuir para a manutenção da frequência ventilatória constante, diminuindo o efeito do estresse metabólico (BECKER et al., 2018). Quanto a espécie *L. sidoides*, quimiotipos timol (68,40%) e carvacrol (67,89%), o efeito anestésico foi alcançado para *R. quelen*, em concentrações de 150-600  $\mu\text{L L}^{-1}$ , mas causa mortalidades (SILVA et al., 2013a). De forma semelhante, em outro estudo com *R. quelen*, ambos os compostos timol e carvacrol, presentes no óleo essencial de *L. sidoides*, apresentaram atividades sedativas (25 mg  $\text{L}^{-1}$ ) e anestésicas (50-100 mg  $\text{L}^{-1}$ ), entretanto, o composto carvacrol promoveu fortes contrações musculares e mortalidade dos peixes (BIANCHINI et al., 2017). Por outro, para outra espécie de peixe como *P. mesopotamicus*, o óleo de *L. sidoides*, quimiotipo timol (61,1%), induziu a anestesia profunda na concentração de 20 mg  $\text{L}^{-1}$ . Nesta concentração as alterações nos parâmetros bioquímicos foram poucas e retornaram aos valores basais em 24 horas. Na avaliação farmacocinética observou-se que o timol foi rapidamente metabolizado no plasma sanguíneo, com a constante e meia vida de distribuição ( $T_{1/2 \alpha}$ ) plasmática de 7,59  $\mu\text{g h}^{-1}(\text{k})$  e 0,09 h, respectivamente. Com base nestas características o uso do óleo de *L. sidoides* é recomendado como anestésico para a espécie (VENTURA et al., 2019). É importante destacar que o timol, composto

majoritário do óleo de *L. sidoides*, interage com os receptores GABA<sub>A</sub> e a ativação destes canais promove a depressão do SNC, estando envolvido no mecanismo de ação sedativa e anestésica em peixes (BIANCHINI et al., 2017).

Para indução anestésica rápida em *R. quelen* o óleo de *C. galioides* (linalol 33,4% e  $\delta$ -cadinol 10,9%) é recomendado nas concentrações de 200-300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , enquanto com o óleo de *O. majorana* (terpineno-4-ol 20,44%, *cis*-terpineno 13,14% e *cis*-terpineol 12,67%) as concentrações de 400-500  $\mu\text{L L}^{-1}$  são as mais adequadas (CUNHA et al., 2017). O composto terpineno-4-ol, presente no óleo de *O. majorana*, também é o composto majoritário do óleo de *M. alternifolia* (41,98%), e em *R. quelen* este óleo induziu a anestesia profunda nas concentrações de 500-1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , e o tempo de indução variou de 5,3-3,1 minutos. Com o composto isolado terpineno-4-ol, a indução anestésica foi alcançada nas concentrações de 200-420  $\mu\text{L L}^{-1}$ , com o tempo de 10,5-1,7 minutos, sendo confirmado, portanto, que o composto terpineno-4-ol é o responsável pela atividade anestésica do óleo de *M. alternifolia*. Em adição, em concentrações sedativas tanto o óleo de *M. alternifolia* (25  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) quanto o composto isolado terpineno-4-ol (42  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) são recomendados para uso em operações de transporte, por melhorar a atividade antioxidante dos peixes em exposições de 6 h (SOUZA et al., 2018a).

Com o óleo essencial de *M. piperita*, cujo composto majoritário é o mentol (27,5%), a concentração média letal deste óleo para *R. quelen*, em 4 horas (CL<sub>50</sub>-4h), foi estimada em 75,06 mg L<sup>-1</sup>, sendo as lesões branquiais, como maior congestão do seio venoso da lamela primária, observada apenas na concentração de 110 mg L<sup>-1</sup>. Assim, com base nestas respostas e também em razão da indução anestésica ocorrer em tempo inferior a 4 minutos na concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, com recuperação em tempo inferior a 10 minutos, o óleo de *M. piperita* foi considerado um eficiente anestésico para a espécie, apresentando uma boa margem de segurança para o peixe, conforme os ensaios de toxicidade (SPANGHERO et al., 2019). O mentol, presente em maiores proporções no óleo essencial de *M. piperita*, tem sua ação anestésica relacionada, em parte, com a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (ZANG et al., 2008). Ainda para *R. quelen* o óleo essencial de *O. micranthum* foi avaliado, sendo estabelecida a concentração de 25  $\mu\text{L L}^{-1}$  para sedação e 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  para anestesia. Com relação à anestesia, a indução à anestesia profunda (<3 min) e a recuperação (<5 min) ocorrem de forma rápida e não houve registro de mortalidade dos peixes. Entretanto, apesar do óleo de *O. micranthum* apresentar características adequadas para sua recomendação como anestésico alternativo para *R. quelen*, a presença do composto estragol (metilchavicol), em grande proporção (58,2%) neste óleo, inviabiliza o seu uso, em razão do seu potencial carcinogênico (ZEPPEFELD et al., 2019).

De forma geral, a resposta ao agente anestésico é bastante variável entre as espécies de peixes, assim como dentro de uma mesma espécie, e estas respostas podem ser resultantes de diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos diferentes anestésicos (ZAHL et al., 2012). Neste sentido, de forma a complementar esta análise com óleos essenciais, na Tabela 3 são apresentadas informações sobre a atividade anestésica dos óleos de várias espécies de plantas para peixes nativos cultivados no Brasil.

**Tabela 3.** Atividade anestésica dos óleos essenciais para peixes nativos.

<b>Óleos essenciais</b>	<b>Peixe</b>	<b>Concentração anestésica</b>	<b>Referências</b>
<i>Aloysia gratissima</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	300-900 mg L <sup>-1</sup>	BENOVIT et al. (2015)
<i>Aloysia polystachya</i>	<i>Epinephelus marginatus</i>	300-400 µL L <sup>-1</sup>	FOGLIARINI et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	200 µL L <sup>-1</sup>	PARODI et al. (2012)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Centropomus parallelus</i>	100-300 µL L <sup>-1</sup>	PARODI et al. (2016)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	150-300 µL L <sup>-1</sup>	SANTOS et al. (2017)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	150 µL L <sup>-1</sup>	ALMEIDA et al. (2018)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	100 µL L <sup>-1</sup>	ALMEIDA et al. (2019)
<i>Citrus x aurantium</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	400-800 µL L <sup>-1</sup>	LOPES et al. (2018)
<i>Citrus x latifolia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	300-500 µL L <sup>-1</sup>	LOPES et al. (2018)
<i>Curcuma longa</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	500 µL L <sup>-1</sup>	SACCOL et al. (2017a)
<i>Cunila galioides</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	200-300 µL L <sup>-1</sup>	CUNHA et al. (2017)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i> x <i>Colossoma macropomum</i>	300 µL L <sup>-1</sup>	LIMMA-NETTO et al. (2016)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	150-300 µL L <sup>-1</sup>	SANTOS et al. (2017)
<i>Hesperozygis ringens</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	111-554 µL L <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2013a)
<i>Hyptis mutabilis</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	344 mg L <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2013b)
<i>Lippia alba</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i> x <i>Colossoma macropomum</i>	200-300 µL L <sup>-1</sup>	SENA et al. (2016)
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	300 µL L <sup>-1</sup>	SOUZA et al. (2017a)
<i>Lippia alba</i>	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	200 µL L <sup>-1</sup>	ALMEIDA et al. (2018)
<i>Lippia alba</i>	<i>Serrasalmus eigenmanni</i>	100 µL L <sup>-1</sup>	ALMEIDA et al. (2019)
<i>Lippia origanoides</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	200-300 µL L <sup>-1</sup>	BECKER et al. (2018)
<i>Lippia sidoides</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	20-70 mg L <sup>-1</sup>	VENTURA et al. (2019)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	500 µL L <sup>-1</sup>	SOUZA et al. (2018a)
<i>Mentha piperita</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	80 mg L <sup>-1</sup>	SPANGHERO et al. (2019)
<i>Myrcia sylvatica</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	200 µL L <sup>-1</sup>	SACCOL et al. (2017a)
<i>Ocimum americanum</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	200-500 mg L <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2015a)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i> x <i>Colossoma macropomum</i>	300 µL L <sup>-1</sup>	LIMMA-NETTO et al. (2016)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	50-100 mg L <sup>-1</sup>	BENOVIT et al. (2012)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	150-300 mg L <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2012)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	20-60 mg L <sup>-1</sup>	RIBEIRO et al. (2016)
<i>Ocotea acutifolia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	300-900 µL L <sup>-1</sup>	SILVA et al. (2013a)

<i>Origanum majorana</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	400-500 $\mu\text{L L}^{-1}$	CUNHA et al. (2017)
--------------------------	-----------------------	------------------------------	---------------------

## 5.2. *Colossoma macropomum*

Embora os estudos com o *C. macropomum* ainda sejam incipientes quanto à avaliação da atividade anestésica com o uso dos óleos essenciais, a espécie *L. alba* é a que vem sendo mais explorada, em parte em função das características anestésicas dos componentes de seu óleo essencial, e em razão das boas respostas já alcançadas em outras espécies de peixes nativos (HELDWEIN et al., 2014; SALBEGO et al., 2014; TONI et al., 2014; SENA et al., 2016; SOUZA et al., 2017; 2018b; ALMEIDA et al., 2018; 2019).

Com o emprego do óleo essencial de *L. alba* (quimiotipo citral), a indução anestésica de *C. macropomum* foi alcançada e estabelecida em 100  $\mu\text{L L}^{-1}$  para peixes com peso de  $1,4 \pm 0,5$  g e em 200 a 300  $\text{mg L}^{-1}$  para tambaquis pesando  $70,4 \pm 1,9$  g (BATISTA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Além da fase de vida dos peixes, a diferença na concentração anestésica pode estar relacionada à composição química dos óleos essenciais, pois embora estes sejam do mesmo quimiotipo, o percentual de citral variou entre as amostras dos dois estudos (55,28 e 42,0 % de citral, respectivamente) (BATISTA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Além do óleo essencial de *L. alba*, um outro produto alternativo desta planta é o hidrolato, subproduto da extração do óleo, o qual é recomendado na concentração de 20% para anestesia de *C. macropomum*, em operações de rotina como biometria e na indução de desova (SANTOS MAIA et al., 2019).

Quando exemplares de *C. macropomum* foram expostos ao estresse de manuseio, as concentrações de 50 e 100  $\text{mg L}^{-1}$  do óleo essencial de *L. alba*, que induzem a anestesia em média entre 52 e 12 minutos respectivamente, não promoveram redução das respostas de estresse, sendo registrado aumento dos níveis de glicose e da amônia plasmática nos peixes (BATISTA et al., 2018). Outros estudos mostram que as respostas fisiológicas de estresse causadas pelo uso do óleo essencial de *L. alba* estão relacionadas apenas ao quimiotipo citral, o mesmo avaliado para *C. macropomum*, apresentando alteração de vários genes (*slc6a2*, *crh*, *hsd20b*, *hspa12a*, e *hsp90*) envolvidos com o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) (SOUZA et al., 2017; 2019). Assim, os estudos com *C. macropomum* devem priorizar o uso do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo linalol.

Outras plantas que vem sendo exploradas quanto à indução anestésica de *C. macropomum* são as espécies *A. rosaeodora*, *A. parviflora*, *C. longa*, *C. nardus*, *M. sylvatica*, *N. cataria*, *O. gratissimum* e *P. divaricatum*, cujas concentrações anestésicas estão apresentadas na Tabela 4. Com o emprego do óleo essencial de *C. nardus*, que tem como constituintes majoritários do seu óleo o geraniol (29,7 %) e o citronelol (13,7 %), a concentração de 600  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi estabelecida para uma rápida indução e recuperação anestésica. Por outro lado, no estudo foi observada depressão do poder de contração muscular e uma depressão cardiorrespiratória transitória, mas que foi reversível o que classifica o óleo essencial de *C. nardus* como um potencial anestésico para *C. macropomum* (BARBAS et al., 2017a).

O óleo de *P. divaricatum*, que apresenta alta concentração de metil eugenol (71,36%) em sua composição, foi avaliado quanto ao seu potencial anestésico para *C. macropomum* e na concentração de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoveu uma rápida indução anestésica (< 3 minutos) e reversível (< 5 minutos), com a perda de tônus muscular. A avaliação das respostas eletromiográficas confirmaram a reversibilidade e retomada do comportamento normal de natação durante a recuperação dos peixes (VILHENA et al., 2019). Com o óleo de *N. cataria*, que na sua composição apresenta 77,6% de nepetalactona, 7,6% de dihidronepetalactona e 3,2% de  $\beta$ -cariofileno, não houve alteração no eletrocardiograma dos peixes, permitindo a manutenção da intensidade normal de ventilação durante a exposição ao óleo essencial, embora tenha ocorrido um ligeiro incremento na taxa de batimento opercular durante a anestesia profunda (SOUZA et al., 2019).

Os óleos essenciais de *C. longa* e *M. sylvatica* são indicados para a sedação (40 e 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente) e anestesia de *C. macropomum* (500 e 200  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente), atuando na redução das respostas ao estresse. Ambos os óleos não alteraram a maioria dos parâmetros bioquímicos, houve ainda redução da peroxidação lipídica e aumento da capacidade antioxidante nos tecidos vitais, minimizando assim os efeitos do estresse oriundo de práticas de manejo utilizadas na piscicultura (SACCOL et al., 2017).

**Tabela 4.** Atividade anestésica dos óleos essenciais para *Colossoma macropomum*.

Óleos essenciais	Concentração	Referências
<i>Aniba rosaeodora</i>	50-200 $\mu\text{L L}^{-1}$	BALDISSEROTTO et al. (2018)
<i>Aniba parviflora</i>	100-300 $\mu\text{L L}^{-1}$	BALDISSEROTTO et al. (2018)
<i>Curcuma longa</i>	200-500 $\mu\text{L L}^{-1}$	SACCOL et al. (2017a)
<i>Cymbopogon nardus</i>	600 $\mu\text{L L}^{-1}$	BARBAS et al. (2017a)
<i>Lippia alba</i> (quimiotipo citral)	200- 300 $\text{mg L}^{-1}$	BATISTA et al. (2018)
<i>Lippia alba</i> (quimiotipo citral)	100 $\mu\text{L L}^{-1}$	SILVA et al. (2019)
<i>Lippia alba</i> (quimiotipo linalol)	200 $\mu\text{L L}^{-1}$	SILVA et al. (2019)
<i>Lippia alba</i> (hidrolato)	20-25 %	SANTOS MAIA et al. (2019)
<i>Myrcia sylvatica</i>	100-200 $\mu\text{L L}^{-1}$	SACCOL et al. (2017a)
<i>Nepeta cataria</i>	175 $\mu\text{L L}^{-1}$	SOUZA et al. (2019)
<i>Ocimum gratissimum</i>	50-100 $\text{mg L}^{-1}$	BOIJINK et al. (2016)
<i>Piper divaricatum</i>	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	VILHENA et al. (2019)

## 6. Transporte de peixes com emprego de óleos essenciais

### 6.1. Peixes nativos

O óleo essencial de *L. alba* foi empregado no transporte de *R. quelen*, com 10  $\mu\text{L L}^{-1}$  deste óleo houve melhora do estado redox dos tecidos dos peixes nos períodos de hipóxia e hiperóxia durante o transporte, evidenciado pelo aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima responsável

por reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas ao oxigênio (AZAMBUJA et al., 2011). Ainda com *R. quelen*, o óleo de *L. alba* (10 e 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), utilizado no transporte da espécie, promoveu redução dos níveis de amônia total e perda de íons (BECKER et al., 2012). Entretanto a utilização de pré-sedação (200  $\mu\text{L L}^{-1}$  *L. alba* por 3 minutos) e adição de 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  na água do transporte de *R. quelen* não minimizou as respostas de estresse, promovendo aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis de oxidação proteica e taxa de peroxidação lipídica, indicando estresse oxidativo (SALBEGO et al., 2014), portanto esta prática de pré-sedação não é recomendada, assim como o transporte de *R. quelen* com 30 e 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de *L. alba* (SALBEGO et al., 2014; BECKER et al., 2016). Já para o transporte da espécie *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*, o óleo essencial de *L. alba* na concentração de 10  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoveu redução das respostas de estresse, com diminuição dos níveis plasmáticos de cortisol e dos níveis de amônia não ionizada (SENA et al., 2016).

A adição de 30 a 50  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de *A. triphylla* na água de transporte reduz a perda de íons em *R. quelen* das linhagens cinza e albina. Entretanto, apesar do aumento dos níveis de cortisol corporal na linhagem albina e redução da perda líquida de íons na linhagem cinza, este óleo é recomendado para o transporte (PARODI et al., 2014). Em outro estudo, o emprego de 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de *A. triphylla* ocasionou baixos níveis de cortisol plasmático, excreção de amônia, alterações ionorregulatórias e melhor estado oxidativo dos peixes, contribuindo para redução das respostas de estresse de transporte em *R. quelen* (ZEPPENFELD et al., 2014). Um outro ponto importante é que esta mesma concentração de *A. triphylla* (40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) é indicada para o transporte de *R. quelen* (peso  $233,2 \pm 45,1$  g) antes do abate, por promover um atraso na perda de frescor e um aumento da vida útil quando do armazenamento em gelo (DANIEL et al., 2014). Por outro lado, para a espécie *P. orbignyanus* a adição do óleo de *A. triphylla* na água de transporte promoveu aumento do nível de glicose, na concentração de 90  $\text{mg L}^{-1}$ , e mortalidade dos peixes nas concentrações de 90 e 135  $\text{mg L}^{-1}$  (8,3% e 100%, respectivamente), não sendo recomendado para esta prática de manejo (BENOVIT et al., 2012). De forma semelhante, o óleo de *A. triphylla*, 10 e 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ , não é recomendado em operações de transporte da espécie *C. parallelus*, por promover a mortalidade de 30 e 70% dos peixes, respectivamente, 24h após o transporte (PARODI et al., 2016).

Para a espécie *B. amazonicus*, o emprego do óleo essencial de *C. longa* (40  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e *M. sylvatica* (10  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) em transporte simulado por 6 horas promoveram redução da síntese ou liberação de cortisol e preveniram o excesso de formação de espécies reativas de oxigênio, sendo recomendadas para o transporte dos peixes por garantir a sua sobrevivência e promover o bem-estar dos peixes (SACCOL et al., 2017a). Ainda com relação ao óleo de *M. sylvatica* (25-35  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), seu uso em *R. quelen* foi capaz de mitigar a ativação das respostas de estresse por transporte, tais como redução dos níveis de cortisol e lactato, assim como menor expressão gênica de *crh*, *pomcb*, *prolactina* e *somatolactin* mRNAs, mantendo sua homeostasia (SACCOL et al., 2018).

O óleo de *O. gratissimum*, 10  $\text{mg L}^{-1}$ , é recomendado como uma alternativa para uso no transporte de *P. orbignyanus*, por não promover alterações em parâmetros de estresse como a glicose

sanguínea e nos parâmetros de qualidade de água como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade, dióxido de carbono, amônia total e não ionizada (BENOVIT et al., 2012). De forma contrária, após o transporte de *C. parallelus*, com duração de 10 horas, o óleo de *N. megapotamica* (15 ou 30  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) não impediu a deterioração da qualidade da água, e os níveis de amônia total aumentaram significativamente. A mortalidade pós-transporte foi significativamente maior nos peixes transportados com 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  de *N. megapotamica*, não sendo, portanto, recomendado para operações de transporte (TONDOLO et al., 2013).

Outras plantas que vem sendo empregadas no transporte de peixes nativos são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Uso de óleos essenciais no transporte de peixes nativos.

Óleos essenciais	Peixe	Concentração	Referências
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	DANIEL et al. (2014)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	30-50 $\mu\text{L L}^{-1}$	PARODI et al. (2014)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	ZEPPENFELD et al. (2014)
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	25 $\mu\text{L L}^{-1}$	BECKER et al. (2017)
<i>Curcuma longa</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	40 $\mu\text{L L}^{-1}$	SACCOL et al. (2017a)
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	AZAMBUJA et al. (2011)
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	10 e 20 $\mu\text{L L}^{-1}$	BECKER et al. (2012)
<i>Lippia alba</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i> x <i>Colossoma macropomum</i>	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	SENA et al. (2016)
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	10 e 20 $\text{mL L}^{-1}$	SALBEGO et al. (2017)
<i>Myrcia sylvatica</i>	<i>Brycon amazonicus</i>	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	SACCOL et al. (2017a)
<i>Myrcia sylvatica</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	25 – 35 $\mu\text{L L}^{-1}$	SACCOL et al. (2018)
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	10 $\text{mg L}^{-1}$	BENOVIT et al. (2012)

## 6.2. *Colossoma macropomum*

Para o transporte de peixes, os anestésicos são utilizados em concentrações sedativas, visto a recuperação da anestesia ser mais rápida e principalmente por contribuir para a atenuação das respostas de estresse (ROSS e ROSS, 2008). Nesse sentido, os óleos essenciais com características anestésicas tem apresentado boas respostas (SENA et al., 2016; SACCOL et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019). Para *C. macropomum*, os estudos avaliando as concentrações efetivas dos óleos essenciais para mitigação das respostas de estresse em operações de transporte são quase inexistentes (Tabela 6). Com o emprego do óleo essencial de *N. grandiflora*, na água de transporte de *C. macropomum*, os níveis de glicose foram baixos e não houve alteração nas concentrações de  $\text{Na}^+$  no sangue dos peixes, sendo então estabelecida a concentração de 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo de *N. grandiflora* como a mais adequada para o transporte de *C.*

*macropomum* (BARBAS et al., 2019). Destaca-se que o composto majoritário do óleo de *N. grandiflora* é o deidrofuquinona, cuja atuação sobre os receptores GABA<sub>A</sub> já foram descritos em *R. quelen* (GARTLET et al., 2016).

Em outro estudo com *C. macropomum*, o uso dos óleos essenciais de *C. longa* (40 µL L<sup>-1</sup>) e de *M. sylvatica* (10 µL L<sup>-1</sup>) promoveram aumento dos níveis de lactato plasmático em relação aos controles, em sistema de transporte aberto, mas por outro lado houve uma diminuição da peroxidação, sendo então recomendado para o transporte de espécie (SACCOL et al., 2016). Um outro protocolo sedativo eficaz para o transporte de juvenis de *C. macropomum* é o uso do hidrolato de *L. alba*, subproduto da extração do óleo essencial, pois na concentração de 5% há um aumento da sobrevivência dos peixes, reduzida concentração de amônia e baixa estimulação e produção de células mucosas branquiais, promovendo uma condição de bem-estar aos animais durante o processo de transporte (SILVA et al., 2017).

**Tabela 6.** Transporte de *Colossoma macropomum* com uso de óleos essenciais.

Óleos essenciais	Concentração	Referências
<i>Curcuma longa</i>	40 µL L <sup>-1</sup>	SACCOL et al. (2016)
<i>Myrcia sylvatica</i>	10 µL L <sup>-1</sup>	SACCOL et al. (2016)
<i>Nectandra grandiflora</i>	30 µL L <sup>-1</sup>	BARBAS et al. (2019)
<i>Lippia alba</i> (hidrolato)	5 %	SILVA et al. (2017)

## 7. Perspectivas para estudos com óleos essenciais em *Colossoma macropomum*

Dentre as 28 espécies de plantas avaliadas quanto à atividade anestésica e redutor de estresse em peixes nativos do Brasil, apresentamos em detalhes cinco destas, que se destacam por serem cultivadas comercialmente no Brasil. Estas plantas quando cultivadas nas condições de Manaus (AM) apresentaram resultados satisfatórios em relação à produção de biomassa, teor de óleo essencial, além de não apresentar problemas relacionadas à propagação, época de corte, adubação, dentre outros. Estas espécies, embora nem todas nativas ou endêmicas do Brasil, apresentam capacidade de se adaptar às condições da **região Amazônica** (altas temperaturas, alta umidade, alta precipitação pluviométrica), assim como em outras regiões do Brasil. Portanto, estas cinco plantas são potenciais candidatas aos estudos visando à indução anestésica e redução de estresse em operações de rotina na criação de *C. macropomum*.

### 7.1. *Aloysia triphylla*

O gênero *Aloysia*, pertence à família Verbenaceae, é uma planta endêmica da América do Sul, cujo centro de distribuição é a Argentina (CARNAT et al., 1999; VALENTAO et al., 2002; PAULUS et al., 2013). A espécie *Aloysia triphylla* (Figura 1) possui vários nomes populares, tais como cidrão, cedrina, cidró, cidró-pessegueiro, erva-luísia e cidrozinho. É um arbusto grande, de dois a três metros de

altura, muito ramificado e ereto. Suas folhas têm uso na medicina tradicional como infusão contra resfriados, insônia e ansiedade, além de indicações como analgésico, sedativo, tônico, antiespasmódico, entre outros (CARNAT et al., 1999; LORENZI e MATOS, 2008).

Em espécimes de *A. triphylla*, cultivadas nas condições de Manaus – AM, foram identificados no seu óleo essencial monoterpenos oxigenados (40,3%), monoterpenos (31,1%), sesquiterpenos oxigenados (14,8%) e sesquiterpenos (10,6%), sendo descritos 98,7% dos compostos deste óleo. Os principais compostos identificados foram:  $\beta$ -pineno (22,1%), trans-pinocarveol (3,7%), cis-pinocanfona (4,9%), acetato de trans-pinocarvilla (7,66%) e guaiol (5,3%) (Tabela 7). Estudos mostram que a atividade anestésica do óleo essencial de *A. triphylla* está relacionada à ação de seus compostos sobre os neurônios entéricos, os quais secretam mais de dez neurotransmissores excitatórios e inibitórios, como a acetilcolina (GRUNDY e SCHEMANN, 2006).

Não há registros quanto ao uso do óleo essencial desta planta no que se refere às atividades sedativas, redutora de estresse, antiparasitária e antimicrobiana para o *C. macropomum*.



**Figura 1.** Espécime de *Aloysia triphylla* cultivada em Manaus - AM (Foto: Franmir Rodrigues Brandão).

**Tabela 7.** Composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla* nas condições de Manaus - AM.

Identificação	Teor (%)	IR*
$\alpha$ -tujeno	0,3	924
$\alpha$ -pineno	3,1	931
canfeno	0,2	946
tuja-2,4(10)-dieno	0,1	951
sabineno	1,0	971
$\beta$ -pineno	22,1	975
mirceno	2,9	989

<i>p</i> -cimeno	0,3	1022
limoneno	2,9	1026
1,8-cineol	0,3	1028
( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,1	1034
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,8	1045
$\gamma$ -terpineno	0,1	1055
<i>cis</i> -hidrato de sabineno	0,2	1064
terpinoleno	0,2	1086
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	0,6	1096
linalol	1,0	1099
<i>trans</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,1	1119
$\alpha$ -canfonelal	0,2	1123
<i>trans</i> -pinocarveol	3,7	1135
<i>cis</i> -verbenol	0,2	1138
<i>trans</i> -verbenol	1,5	1141
<i>trans</i> -pinocanfona	13,1	1157
pinocarvona	2,2	1159
<i>cis</i> -pinocanfona	4,9	1170
terpinen-4-ol	0,5	1174
<i>p</i> -cimen-8-ol	0,2	1183
$\alpha$ -terpineol	0,3	1188
mirtenol	2,5	1193
verbenona	0,1	1207
<i>trans</i> -carveol	0,2	1217
acetato de isobornila	0,5	1283
acetato de <i>trans</i> -pinocarvila	7,6	1297
acetato de mirtenila	0,1	1323
$\alpha$ -copaeno	0,1	1371
$\beta$ -bourboneno	0,2	1380
$\beta$ -elemeno	0,2	1388
( <i>E</i> )-cariofileno	2,9	1414
$\gamma$ -elemeno	0,1	1429
$\alpha$ -humuleno	0,8	1448
<i>allo</i> -aromadendreno	0,2	1455
germacreno D	2,0	1476
biciclogermacreno	1,3	1491
germacreno A	0,2	1499
$\gamma$ -cadineno	0,3	1510
$\delta$ -cadineno	0,1	1519
elemol	0,5	1545
germacreno B	2,2	1551
espatulenol	1,8	1572
óxido de cariofileno	3,0	1577
guaiol	5,3	1593
rosifoliol	0,9	1602
<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol	0,3	1636

bulsenol	1,8	1662
eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	0,1	1680

\*IR = índice de retenção

## 7.2. *Lippia alba*

A espécie *L. alba* (Figura 2), pertencente à família Verbenaceae, é conhecida popularmente como erva-cidreira, carmelitana, é um subarbusto aromático que ocorre em diversos países como Índia, México, Paraguai, Austrália e Brasil, entre outros. Apresenta ramos delgados e lisos, folhas de bordas irregulares e inflorescências arroxeadas. Tem grande importância na medicina popular, pois é usada principalmente como sedativo, analgésico, anestésico, anti-inflamatório, antibacteriana, entre outros (LORENZI e MATOS, 2008).

Em espécimes de *L. alba*, cultivadas nas condições de Manaus – AM, foram identificados no seu óleo essencial monoterpenos oxigenados (70,2%), monoterpenos (16,5%), sesquiterpenos (8,0%) e sesquiterpenos oxigenados (4,9%), sendo descritos 96,9% dos compostos deste óleo. Os principais compostos identificados foram: geranial (35,8%), neral (28,7%) e mirceno (13,5%) (Tabela 8). A ação sedativa do óleo essencial de *L. alba* é atribuída ao composto citral (geranial e neral) (VALE et al., 2002), e a ação anestésica deste óleo foi associada ao sistema GABAérgico (HELDWEIN et al., 2012).

As atividades anestésicas, antiparasitária e antimicrobiana do óleo essencial de *L. alba* já foram estabelecidas para o *C. macropomum* (MAJOLO et al., 2017; 2018; SOARES et al., 2016; BATISTA et al., 2018).



**Figura 2.** Espécime de *Lippia alba* cultivada em Manaus - AM (Fonte: Susanne Regina Nazaré de Oliveira).

**Tabela 8.** Composição química do óleo essencial de *Lippia alba* nas condições de Manaus - AM.

Identificação	Teor (%)	IR*
sabineno	0,1	969
1-octen-3-ol	0,1	974
6-metil-5-hepten-2-ona	1,4	981
mirceno	13,5	988
limoneno	0,1	1024
1,8-cineol	0,6	1026
(Z)- $\beta$ -ocimeno	0,5	1032
(E)- $\beta$ -ocimeno	0,8	1044
6,7-epóxi-mirceno	0,1	1090
linalol	0,9	1098
óxido de $\alpha$ -pineno	0,2	1099
citronelal	0,2	1148
cis-crisantemol	0,4	1160
$\alpha$ -terpineol	0,1	1186
nerol	1,1	1227
neral	28,7	1235
geraniol	0,8	1249
geranial	35,8	1264
$\beta$ -elemeno	1,2	1389
(E)-cariofileno	3,9	1417
$\alpha$ -humuleno	0,2	1452
(E)- $\beta$ -farneseno	0,2	1454
germacreno D	1,2	1480
cis- $\beta$ -guaieno	0,2	1492
germacreno A	0,5	1508
$\gamma$ -cadineno	0,3	1513
$\delta$ -cadineno	0,3	1522
(E)-nerolidol	0,4	1561
espatulenol	0,1	1577
óxido de cariofileno	2,6	1582
epóxido de humuleno II	0,1	1608
$\alpha$ -cadinol	0,3	1652

\*IR= índice de retenção

### 7.3. *Lippia sidoides*

A espécie *L. sidoides* (Figura 3), conhecida como alecrim pimenta, é uma espécie própria da vegetação do semiárido nordestino, ocorre como uma arvoreta ou subarbusto densamente ramificado de até 2 m de altura, com tronco de até 8 cm de diâmetro, muito usada na indústria de perfumaria, alimentos e cosméticos (REIS, 2009). Além disso, é bastante usada na medicina popular na forma de chá ou tintura das folhas, raízes e talos; como antisséptico, antioxidante e antimicrobiano, entre outros (LORENZI e MATOS, 2008).

No óleo essencial de *L. sidoides* cultivada em Manaus – AM foram identificados monoterpenos oxigenados (77,1%), monoterpenos (14,6%), sesquiterpenos (6,8%) e sesquiterpenos oxigenados (1,4%), sendo identificados 99,4% dos compostos deste óleo. Os principais compostos identificados no óleo

essencial de *L. sidoides* foram: timol (72,2%), *p*-cimeno (8,1%), (*E*)-cariofileno (4,9%) e  $\gamma$ -terpineno (2,2%) (Tabela 9). Estudos mostram que o timol, composto majoritário do óleo de *L. sidoides*, interage com os receptores GABA<sub>A</sub> e a ativação destes canais promove a depressão do SNC, estando envolvido no mecanismo de ação sedativa e anestésica (BIANCHINI et al., 2017).

Com o óleo essencial de *L. sidoides* foram descritas atividades antiparasitária e antimicrobiana para o *C. macropomum* (MAJOLO et al., 2017; 2018; SOARES et al., 2017a; BATISTA et al., 2018).



**Figura 3.** Espécime de *Lippia sidoides* cultivada em Manaus - AM (Foto: Susanne Regina Nazaré de Oliveira).

**Tabela 9.** Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* nas condições de Manaus - AM.

Identificação	Teor (%)	IR*
$\alpha$ -tujeno	0,5	924
$\alpha$ -pineno	0,3	932
$\beta$ -pineno	0,1	974
mirreno	1,5	988
$\alpha$ -felandremo	0,1	1002
$\delta$ -3-careno	0,1	1008
$\alpha$ -terpineno	0,9	1014
<i>p</i> -cimeno	8,1	1022
limoneno	0,6	1024
1,8-cineol	0,5	1026
( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,1	1032
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	0,1	1044
$\gamma$ -terpineno	2,2	1054
terpinoleno	0,1	1086
linalol	0,1	1098
ipsidienol	0,5	1140
terpinen-4-ol	1,1	1174

$\alpha$ -terpineol	0,1	1186
timol, metil-éter	1,0	1232
timol	72,2	1289
carvacrol	0,9	1298
$\alpha$ -copaeno	0,5	1374
( <i>E</i> )-cariofileno	4,9	1417
aromadendreno	0,4	1429
$\alpha$ -humuleno	0,2	1452
<i>allo</i> -aromadendreno	0,1	1458
viridifloreno	0,3	1496
$\alpha$ -muuroleno	0,1	1500
$\delta$ -cadineno	0,3	1522
espatulenol	0,2	1577
óxido de cariofileno	1,3	1582

\*IR = índice de retenção

#### 7.4. *Mentha piperita*

O gênero *Mentha*, pertencente à família Lamiaceae, está distribuído em áreas tropicais e temperadas do mundo. Foram descritos cerca de 240 gêneros e 7200 espécies, e no Brasil estão presentes 46 gêneros e 524 espécies nativas ou introduzidas (HARLEY, 2012). Seu cultivo é difundido em todas as regiões do Brasil e nessa planta estão reunidas, em elevado grau, propriedades anestésicas, antiespasmódicas, estomático-estimulantes e antimicrobiana, entre outras (LORENZI e MATOS, 2008; OLIVEIRA, 2011). *M. piperita* (Figura 4) é conhecida popularmente como água-de-avante, alevante e hortelã-pimenta, sendo descrita como erva aromática, anualmente ou perene de mais ou menos 30 cm de altura, semi reta, com ramos de cor verde escuro a roxo-púrpuro, folhas elíptico-acuminadas, dentada e muito aromáticas (LORENZI e MATOS, 2008; OLIVEIRA, 2011).

No óleo essencial de *M. piperita*, cultivada em Manaus – AM, foram identificadas dos monoterpenos oxigenados (86,2 %), monoterpenos (10,1 %), sesquiterpenos (2,5 %) e sesquiterpenos oxigenados (0,3 %), sendo identificados 99,1% dos compostos deste óleo. Os principais compostos identificados no óleo essencial de *M. piperita* foram: mentol (33,8 %), mentona (15,2 %), acetato de mentila (13,0 %), pulegona (8,3 %) e mentofurano (6,2%) (Tabela 10). Presente em maiores proporções no óleo essencial de *M. piperita*, o mentol tem sua ação anestésica relacionada, em parte, com a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (ZANG et al., 2008).

As atividades antiparasitária e antimicrobiana do óleo essencial de *M. piperita* foram descritas para *C. macropomum* (MAJOLO et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).



**Figura 4.** Espécime de *Mentha piperita* cultivada em Manaus - AM (Foto: Susanne Regina Nazaré de Oliveira).

**Tabela 10.** Composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* nas condições de Manaus - AM.

Identificação	Teor (%)	IR*
$\alpha$ -pineno	1,0	932
canfeno	1,3	946
sabineno	0,2	969
$\beta$ -pineno	1,2	974
6-metil-5-hepten-2-ona	0,2	981
mirceno	1,3	988
<i>p</i> -cimeno	0,3	1022
limoneno	4,7	1024
1,8-cineol	2,8	1026
$\gamma$ -terpineno	0,1	1054
linalol	0,2	1099
<i>iso</i> -pulegol	0,1	1145
mentona	15,2	1148
mentofurano	6,2	1159
mentol	33,8	1167
terpinen-4-ol	1,3	1174
<i>iso</i> -mentol	0,2	1179
$\alpha$ -terpineol	0,3	1186
pulegona	8,3	1233
neral	1,3	1235
piperitona	1,6	1249
geranial	1,1	1264
acetato de <i>neo</i> -mentila	0,9	1271
acetato de mentila	13,0	1294
( <i>E</i> )-cariofileno	0,4	1417
<i>ar</i> -curcumeno	0,6	1479
$\alpha$ -zingibereno	0,4	1493
$\beta$ -bisaboleno	0,5	1505

$\beta$ -sesquifelandreno	0,4	1521
óxido de cariofileno	0,3	1582

\*IR = índice de retenção

### 7.5. *Ocimum gratissimum*

O gênero *Ocimum*, pertencente à família Lamiaceae, está distribuído em áreas tropicais da África, América e Ásia. A espécie *Ocimum gratissimum* (Figura 5) é comumente conhecida como alfavaca-cravo, alfavacão e manjerição (FERNANDES et al., 2013; SILVA et al., 2015; BANDEIRA Jr et al., 2017). Seu uso na medicina popular se destaca por suas propriedades antifúngicas, antioxidantes, anestésicas, entre outras (LORENZI e MATOS, 2008).

No óleo essencial de *O. gratissimum*, cultivada em Manaus – AM, foram identificados 97,1% dos compostos deste óleo. Os principais compostos identificados no óleo essencial de *O. gratissimum* foram: eugenol, 1,8-cineol e  $\beta$ -selineno (Tabela 11). A atividade anestésica deste óleo essencial está relacionada ao sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub> (SILVA et al., 2012).

Para *C. macropomum* foram descritas atividades anestésica, antiparasitária e antimicrobiana com o emprego do óleo essencial de *O. gratissimum* (BOIJINK et al., 2016; MAJOLO et al., 2018).



**Figura 5.** Espécime de *Ocimum gratissimum* cultivada em Manaus - AM (Foto: Susanne Regina Nazaré de Oliveira).

**Tabela 11.** Composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* nas condições de Manaus - AM.

Identificação	Teor (%)	IR*
sabineno	0,7	975
$\beta$ -pineno	2,8	976
mirreno	0,7	988
1,8-cineol	28,2	1030
cis-ocimeno	3,7	1038

linalol	1,3	1100
$\delta$ -terpineol	0,4	1166
terpineol-4-ol	0,4	1175
$\alpha$ -terpineol	1,1	1190
eugenol	43,3	1357
$\beta$ -bourboneno	0,9	1381
$\beta$ -elemeno	0,8	1389
( <i>E</i> )-cariofileno	3,7	1415
$\alpha$ -humuleno	0,6	1450
$\gamma$ -muuroleno	0,9	1477
$\beta$ -selineno	5,5	1482
$\alpha$ -selineno	1,7	1490
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno	0,4	1513

\*IR = índice de retenção

## 8. Conclusão

A prospecção de óleos essenciais de plantas com potencial anestésico para a aquicultura tem promovido diversos estudos com espécies de peixes nativas, principalmente com *Colossoma macropomum* e *Rhamdia quelen*, para aplicação nas atividades de manuseio, biometria e transporte. Os óleos essenciais mostram ter um efeito anestésico, atuando ainda como redutores de estresse, porém percebe-se que há diferenças nas respostas quando do emprego do mesmo óleo essencial para diferentes espécies ou para a mesma espécie em diferentes fases de vida, e estas respostas podem ser resultantes de diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos diferentes anestésicos. Portanto, a definição de dosagens seguras e os mecanismos de ação dos seus compostos ainda precisam ser esclarecidos. Além disso, a maior parte dos estudos com anestésicos naturais para as espécies de peixes nativas incluem apenas informações de indução e recuperação anestésica, sendo os estudos da aplicação em outras práticas de manejo como adensamento, manuseio e transporte muito mais restritos. Para *C. macropomum*, apenas os óleos essenciais de quatro espécies de plantas foram avaliadas para uso no seu transporte. Portanto, mostra-se necessário mais estudos com *C. macropomum* visando o estabelecimento de anestésicos naturais eficiente em baixas concentrações e com o mínimo de efeitos adversos, além da avaliação da toxicidade das espécies vegetais que já vêm sendo recomendadas. E nesse sentido, a avaliação de novas tecnologias como a ferramenta de nanotecnologia pode contribuir para aumentar a eficácia dos óleos essenciais e garantir uma liberação direcionada e sustentada, potencializando as atividades biológicas dos óleos essenciais, a exemplo das atividades anestésicas e redutoras de estresse.

## Agradecimentos

À Embrapa (MP2 - 02.12.01.020.00.00) pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo concedida a F.R. Brandão. Os autores

agradecem a bióloga Susanne Regina Nazaré de Oliveira pelo fornecimento das imagens.

## Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico

## Referências

- ALMEIDA, A. P. G.; CORREIA, T. G.; HEINZMANN, B. M.; VAL, A. L.; BALDISSEROTTO, B. Stress-reducing and anesthetic effects of the essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* on *Serrasalmus eigenmanni* (Characiformes: Serrasalminidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 2, 2019.
- ALMEIDA, A. P. G.; HEINZMANN, B. M.; VAL, A. L.; BALDISSEROTTO, B. Essential oils and eugenol as anesthetics for *Serrasalmus rhombeus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 1, p. 44-50, 2018.
- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish. **Aquaculture**, v. 520, e734999, 2020.
- AZAMBUJA, C. R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A. P. K.; FINAMOR, I. A.; GARCIA, L. O.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319 n. 1-2, p. 156–161, 2011.
- BABICH, H.; PALACE, M. R.; STERN, A. Oxidative stress in fish cells: in vitro studies. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 24, n. 2, p. 173–178, 1993.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the Stress Responses in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 62, 2019.
- BALDISSEROTTO, B.; BARATA, L. E. S.; SILVA, A. S.; LOBATO, W. F. F. SILVA, L. L.; TONI, C.; SILVA, L. V. F. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n.1, e1701281, 2018.
- BANDEIRA Jr. G.; PÊS, T. S.; SACCOL, E. M. H.; SUTILI, F. J.; ROSSI Jr, W. R.; MURARI, A. L.; HEINZMANN, B. M.; PAVANATO, M. A.; VARGAS, A. C.; SILVA, L. L.; BALDISSEROTTO, B. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017.
- BARBAS, L. A. L., MALTEZ, L. C., STRINGHETTA, G. R., DE OLIVEIRA GARCIA, L., MONSERRAT, J. M., DA SILVA, D. T., HEINZMANN, B. M., SAMPAIO, L. A. Properties of two plant extractives as anaesthetics and

antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 79–87, 2017b.

BARBAS, L. A. L.; ARAÚJO, E. R. L.; TORRES, M. F.; MALTEZ, L. C.; LGARCIA, L. O.; HEINZMANN, B. M.; SAMPAIO, L. A. Stress relieving potential of two plant-based sedatives in the transport of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, e73468, 2019.

BARBAS, L. A. L.; HAMOYB, M.; MELLO, V. J.; BARBOSA, R. P.M.; LIMA, H. S. T.; TORRES, M. F.; NASCIMENTO, L. A. S.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; GOMES, M. R. F. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. **Aquaculture**, v. 479, p. 60–68, 2017a.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

BATISTA, E. S.; BRANDÃO, F. R.; MAJOLO, C.; INOUE, L.A.K.A.; MACIEL, P.O.; OLIVEIRA, M.R.; CHAVES, F.C.M.; CHAGAS, E.C. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, v. 495, p. 545–549, 2018.

BECKER, A. G.; LUZ, R. K.; MATTIOLI, C. C.; NAKAYAMA, C. L.; SILVA, W. S.; LEME, F.O. P.; MENDES, H. C. P. M.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport?. **Aquaculture**, v. 481, p. 184-190, 2017.

BECKER, A. G.; PARODI, T. V.; HELDWEIN, C. G.; ZEPPEFELD, C. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 789-796, 2012.

BECKER, A. G.; PARODI, T. V.; ZEPPEFELD, C. C.; SALBEGO, J.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; LORO, V. L.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. **Fish physiology and biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 73-81, 2016.

BECKER, A. J.; FOGLIARINI, C. O.; SOUZA, C. F.; BECKER, A. G.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: a comparative approach between different essential oils. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, e20170185, 2018.

BENOVIT, S. C.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. L. Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 6, p. 896-900, 2012.

BENOVIT, S. C.; SILVA, L. L.; SALBEGO, J.; LORO, V. L.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E. M. M.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 87, n. 3, p. 1675-1689, 2015..

- BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; CUNHA, J. A.; BANDEIRA JUNIOR, G.; BRUSQUE, I. C. M.; SALBEGO, J.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, e6346, 2017.
- BIRNIE-GAUVIN, K., COSTANTINI, D., COOKE, S. J., WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017.
- BOIJINK, C. L.; QUEIROZ, C. A.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; INOUE, L. A. K. A. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24–28, 2016.
- BOLASINA, S. N.; 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, 2017.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Revista Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 349-356, 2006.
- BRANVANDERZWALMEN<sup>1</sup>, M.; EATON, L.; MULLEN, C.; HENRIQUEZ<sup>1</sup>, F.; CAREY, P. F.; SNELGROVE, D.; SLOMAN, K. A. The use of feed and water additives for live fish transport. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, p. 263–278, 2019.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253, 2004.
- CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. **Fitoterapia**, v. 70, p. 44-49, 1999.
- CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 21, p. 51–59, 2011.
- COSTA, O. T. F.; DIAS, L. C.; MALMANN, C. S. Y.; LIMA FERREIRA, C. A.; CARMO, I. B.; WISCHNESKI, A. G.; SOUSA, R. L.; CAVERO, B. A. S.; LAMEIRAS, J. L. V., DOS-SANTOS, M. C. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 499, p. 260–268, 2019.
- CUNHA, J. A.; SUTILI, F. J.; OLIVEIRA, A. M.; GRESSLER, L.; SCHEEREN, C. A.; SILVA, L. L.; VAUCHER, R.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. The essential oil of *Hyptis mutabilis* in *Ichthyophthirius multifiliis* infection and its effect on hematological, biochemical and immunological parameters in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Journal of Parasitology**, v. 103, n. 6, p. 778-785, 2017.
- DANIEL, A.P.; VEECK, A. P. L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; CUNHA, M. A.; PARODI, T. V.; ZEPPENFELD, C. C.;SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L’Her.)

Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. **Journal Food Sci.**, v. 79, S1205–S1211, 2014.

DIAS, H. M.; SANTOS, R. F. B.; PEREIRA, N. L.; SOUSA, N. C.; COUTO, M. V. S.; ABE, H. A.; FUJIMOTO, R. Y. Toxicological effects of four chemicals used for prophylaxis of Amazonian ornamental fish. **Biota Amazônia**, v. 8, p. 13-16, 2018.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018 Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO - United Nations Food and Agriculture Organization. Standards Programme, & World Health Organization Codex alimentarius commission. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2007. Licencia: CC BY-NC-SA 00153 IGO.

FAUGHT, E.; VIJAYAN, M. M. Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 199, p. 136–145, 2016.

FERNANDES, V. F.; ALMEIDA, L. B.; FEIJÓ, E. Y. R. S.; SILVA, D. C.; OLIVEIRA, R. A.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. B. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013.

FERREIRA, D.; BARCELLOS, L. J. G. I. L. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 601–611, 2008.

FOGLIARINI, C. O.; GARLET, Q. I.; PARODI, T. V.; BECKER, A. G.; GARCIA, L. O.; HEINZMANN, B. M.; PEREIRA, A. M. S.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of *Epinephelus marginatus* with essential oil of *Aloysia polystachya*: an approach on blood parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1. p. 445-456, 2017.

GARLET, Q. I.; PIRES, L. C.; SILVA, D. T.; SPALL, S.; GRESSLER, L. T.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal Med. Biology. Res.**, v. 49, e4872, 2016.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Santa Maria: UFSM, p. 175-204, 2010.

GRUNDY, D.; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 22, p. 102–110, 2006.

- HARLEY, R.M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguéia**, v. 63, p. 129-144, 2012.
- HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; GAI, E. Z.; ROMAN, C.; PARODI, T. V.; BURGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B. M. S-(C)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 41, p. 621–629, 2014.
- HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F. M. C.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN B. M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p.436-443, 2012.
- HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anestesia do pirarucu por aspersão da benzocaína diretamente nas brânquias. **Ciência Rural**, v. 40, p. 204-207, 2010.
- HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009.
- HOSEINI, S. M.; MIRGHAED, A., T.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 550–564, 2019.
- HUNTINGFORD, F. A.; KADRI, S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 33, n. 1, p. 233–244, 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, v. 46, p. 1-8, 2018.
- IZEL, A. C. U.; CRESCENCIO, R.; O´SULLIVAN, F. L. A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. L.; SILVA, J. I. Produção intensiva de tabaqui em tanques escavados com aeração. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental (Circular técnica, 39), 4 p. 2013.
- IZEL, A. U.; CRESCENCIO, R.; O´SULLIVAN, F. L. A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. L. Cultivo do tabaqui no Amazonas, 2a edição revista e atualizada. 2a. ed. Brasília: Embrapa, p. 59, 2018.
- KIILERICH, P.; SERVILI, A.; PERON, S.; VALOTAIRE, C.; GOARDON, L.; LEGUEN, I.; PRUNET, P. Regulation of the corticosteroid signalling system in rainbow trout HPI axis during confinement stress. **General and comparative endocrinology**, v. 258, p. 184–193, 2018.
- LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 253–278, 2006.
- LIMMA-NETTO, J. D.; SENA, A. C.; COPATTI, C. E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male X *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 727-733, 2016.
- LOPES, J. M.; SOUZA, C. F.; SCHINDLER, B.; PINHEIRO, C. G.; SALBEGO, J.; SIQUEIRA, J. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Essential oils from *Citrus x aurantium* and *Citrus x latifolia*

(Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, e170152, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2.ed., 2008, 544p.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S. I. B.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reviews**, v. 48, p. 2380–2387, 2017.

MAJOLO, C.; PILARSKI, F.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; CHAGAS, E. C. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. **Jornal of Essential Oil Research**, v. 30, p. 388–397, 2018.

MARCIAL, G.; LAMPASONA, M. S.; VEJA, M. I.; LIZARRAGA; VITURRO, C. I.; SLANIS, A.; JUAREZ, M. A.; ELECHOSA, M. A.; CATALAN, C. A. N. Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (Verbenaceae). Evidence for five chemotypes. **Phytochemistry**, v. 122, p. 203–212, 2016.

OLIEVEIRA, A. R. M. F. Produção de óleo essencial de *Mentha piperita* var. citrata sob diferentes condições de manejo. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômica) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265–275, 2011.

PARK, I. S.; GIL, H. W.; LEE, T. H.; NAM, Y. K.; LIM, S. G.; KIM, D. S. Effects of clove oil and lidocaine-HCl anesthesia on water parameter during simulated transportation in the marine medaka, *Oryzias dancena*. **Development e reproduction** v. 21, p. 19-33, 2017.

PARODI, T. V.; CUNHA, M. A.; BECKER, A. G.; ZEPPENFELD, C.C.; MARTINS, D. I.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 323–334, 2014.

PARODI, T. V.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; SOUZA, D. M.; MARTINS, A. C.; GARCIA, L. O.; WASIELESKY-Jr., W.; MONSERRAT, J. M.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, p. 462–468, 2012.

PARODI, T. V.; SANTOS, C. A. D.; VERONEZ, A.; GOMES, LDC.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Indução e recuperação anestésica de *Centropomus parallelus* expostos ao óleo essencial de *Aloysia triphylla*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2142-2147, 2016.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G. A.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 372-379, 2013.

PEIXE BR - Anuário Brasileiro de piscicultura, 2020  
<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>. Acesso em 15 de fev. 2020

PICKERING, A. D. **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981.

PRATTE-SANTOS, R.; CARRIELO, F. A. D. Toxicidade aguda de eugenol em juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Cient. Faminas**, v. 5, p. 95–104, 2009.

PURBOSARI, N.; WARSIKI, E.; SYAMSU, K.; SANTOSO, J. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A Review. **Aquaculture and Fisheries**, v. 4, p. 129-133, 2019.

RAO, J. V.; BEGUM, G.; PALLELA, R.; USMAN, P .K.; RAO, R. N.Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. **International Journal of Environmental Research and public health**, v. 2, n. 3, p. 478–483, 2005.

REIS, F. B. Bioconservação de pescado (surubim - *Pseudoplatystoma sp.*) com utilização de bactéria láctica bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippai sidoides* Cham.). 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada a Farmacia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RIBEIRO, A. S.; BATISTA, E. D. S.; DAIRIKI, J. K.; CHAVES, F. C. M.; INOUE, L. A. K. A. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2016.

ROSS, L. G. & ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. London: Blackwell Publishing, 2008, 222 p.

SACCOL, E. M. H.; JEREZ-CEPA, I.; OURIQUE, G. M.; PÊS, T. S.; GRESSLER, L. T.; MOURÃO, R. H. V.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; MANCERA, J. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; MARTOS-SITCHA, J. A. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 150-160, 2018.

SACCOL, E. M. H.; LONDERO, É. P.; BRESSAN, C. A.; SALBEGO, J.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. V. F.; MOURÃO, R. H. V.; OLIVEIRA, R. B.; LLESUY, S. F.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 44, n. 3, p. 555-566, 2017b.

SACCOL, E. M. H.; TONI, C.; PÊS, T. S.; OURIQUE, G. M.; GRESSLER, L. T.; SILVA, V. F.; MOURÃO, R. H. V.; OLIVEIRA, R. B.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Anaesthetic and antioxidant effects of

*Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research**, v. 48, p. 2012–2031, 2016.

SACCOL, E. M. H.; TONI, C.; PÊS, T.; OURIQUE, G. M.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. V. F.; MOURÃO, R.; OLIVEIRA, R. B.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 2012-2031, 2017a.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, p. 1–9, 2017.

SALBEGO, J.; BECKER, A. G.; GONÇALVES, J. F.; MENEZES, C. C.; HELDWEIN, C. G.; SPANEVELLO, R. M.; LORO, V. L.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, 811-818, 2014.

SAMPAIO, F. D. F.; FREIRE, C. A. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish Fisheries**, v. 17, p. 1055–1072, 2016.

SANTOS MAIA, J. L.; SOUSA, E. M.O.; SILVA, H. N. P.; PINHEIRO, M. T. L.; MOURÃO, R. H. V.; MAIA, J. G. S.; LAMEIRÃO, S. V. O. C.; BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L. V. F. Hydrolate toxicity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its potential anaesthetic properties. **Aquaculture**, v. 503, p. 367-372, 2019.

SANTOS, A. C.; JUNIOR, G. B.; ZAGO, D. C.; ZEPPEFELD, C. C.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M. A. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 44, p. 106–113, 2017.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, A. M. **Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids**. Investigations in Fish Control, US Fish and Wildlife Service, no. 13, 1969.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. In: SCHRECK, C. B. **Biology of Stress in Fish**. Academic Press., v. 35p. 1–34, 2016.

SENA, A. C.; TEIXEIRA, R. R.; FERREIRA, E. L.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R.D.; COPATTI, C. E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374–379, 2016.

SILVA, H. N. P.; CARVALHO, B. C. F.; MAIA, J. L. S.; BECKER, A. G.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural**, v. 49, n. 6, e20181059, 2019.

SILVA, H. N. P.; SOUSA, E. M. D. O.; MAIA, J. L. D. S.; PINHEIRO, M. T. L.; LAMEIRÃO, S. V. D. O. C.; MOURÃO, R. H. V.; MAIA, J. G. S.; BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L. V. F. *Lippia alba* (Verbenaceae)

hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 1, 128-134, 2017.

SILVA, L. L.; GARLET, Q. I.; BENOVI, S. C.; DOLCI, G.; MALLMANN, C. A.; BURGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; HEINZMANN, B. M. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 771–779, 2013a.

SILVA, L. L.; GARLET, Q. I.; KOAKOSKI, G.; ABREU, M. S.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; BARCELLOS, L. J. G.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 4, p. 715-722, 2015b.

SILVA, L. L.; GARLET, Q. I.; KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17 n. 2, p. 215–223, 2015a.

SILVA, L. L.; PARODI, T. V.; RECKZIEGEL, P.; GARCIA, V. O.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350, p. 91–97, 2012.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 443–451, 2013b.

SILVEIRA, U. S. DA; LOGATO, P. V. R.; CONCEIÇÃO PONTES, E. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista eletrônica nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817–836, 2009.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 177-185, 2003.

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. Stress indicators in fish. In: **Fish physiology**, Elsevier, 2016. v. 35, p. 405–462.

SOUZA, A. S. L.; PERET, A. C.; HAMOY, M.; DE SOUZA, R. A. L.; TORRES, M. F.; BARBAS, L. A. L. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: Implications on cardiorespiratory responses. **Aquaculture**, v. 500, p. 160–169, 2019.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MANCERA, J. M. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. **Frontiers in physiology**, v. 10, 785, 2019.

- SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; BIANCHINI, A. E.; SILVA, E. G.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F.; SCHMIDT, D.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 21–34, 2018a.
- SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; SALBEGO, J.; LOPES, J. M.; VAUCHER, R. A.; MOURÃO, R. H. V.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, e160083, 2017b.
- SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; SILVA, L. L.; GEIHS, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish?. **Aquaculture**, v. 486, p. 217–223, 2017a.
- SPANGHERO, D. B. N.; SPANGHERO, E. C. A. M.; PEDRON, J. S.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; ZANIBONI-FILHO, E. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00367, 2019.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, p. 913–918, 2017.
- TEIXEIRA, R. R.; SOUZA, R. C.; SENA, A. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 3383–3392, 2017.
- TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; SILVA, L. L.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anaesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701–714, 2014.
- TRIPATHI, G.; VERMA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 463–471, 2003.
- UEHARA, S. A.; ANDRADE, D. R.; TAKATA, R.; JÚNIOR, A. V. G.; VIDAL, M. V. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. **Aquaculture**, v. 502, p. 326–331, 2019.
- VAL, A. L.; GOMES, K. R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. DE. Rapid regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian fish *Prochilodus nigricans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 184, p. 125–131, 2015.

- VALE, T G.; FURTADO, E. C.; SANTOS, J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.
- VALENTAO, P.; FERNÁNDES, F. E.; CARVAHLO, P. B.; ANDRADE, R. M.; SEABRA, M. L. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusión: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 25, n. 10, p. 1324-1327, 2002.
- VALLADÃO, G. M. R.; ALVES, L. O.; PILARSKI, F. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: Diagnosis, parasite, host-stage relationship and treatment. **Aquaculture**, v. 451, p. 444-450, 2016.
- VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 351-369, 2018.
- VENTURA, A .S.; CASTRO SILVA, T. S.; ZANON, R. B.; INOUE, L. A. K. A.; CARDOSO, C. A. L. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, p. 1–12, 2019.
- VILHENA, C. S.; NASCIMENTO, L. A. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; HAMOYC, M.; TORRES, M. F.; BARBAS, L. A. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 510, p. 169–175, 2019.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.
- WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 340-347, 2002.
- ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiol Biochem**, v. 38, p. 201–218, 2012.
- ZANG, X. B.; JIANG, P.; GONG, N.; HU, X. L.; FEI, D.; XIONG, Z. Q.; XU, L.; XU, T. L. A-Type GABA Receptor as a Central Target of TRPM8 Agonist Menthol. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, e3386, 2008.
- ZEPPENFELD, C. C.; BRASIL, M. T. B.; CAVALCANTE, G.; SILVA, L. V. F.; MOURÃO, R. H.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction of juveniles of *Rhamdia quelen* and *Ctenopharyngodon idella* with *Ocimum micranthum* essential oil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 1, e20180218, 2019.
- ZEPPENFELD, C. C.; TONI, C.; BECKER, A. G.; MIRON, D. S.; PARODI, T. V.; HEINZMANN, B. M.; BARCELLOS, L. J. G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J. G. S.; LORO, V. L.; CUNHA, M.A.; BALDISSEROTTO, B. 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, p. 101-107, 2014.

## Capítulo II

### **Potencial anestésico dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Mentha piperita* e *Aloysia triphylla* para o tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Artigo elaborado conforme normas do periódico Aquaculture. ISSN (eletrônico):  
0044-8486.

**Potencial anestésico dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* para *Collossoma macropomum***

Franmir Rodrigues Brandão<sup>a</sup>, Caio Francisco Santana Farias<sup>b</sup>, Cláudia Majolo<sup>c</sup>, Damy Caroline de Melo Souza<sup>a</sup>, Maria Inês Braga de Oliveira<sup>a</sup>, Lorena Vieira de Matos<sup>d</sup>, Marcelo Róseo de Oliveira<sup>c</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>c</sup>, Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan<sup>a,c</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, **Brasil**

<sup>b</sup>Uninorte Laureate International Universities, Av. Joaquim Nabuco 1469, Centro, 69020-030, Manaus, AM, **Brasil**

<sup>c</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, Brasil

<sup>d</sup>Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, **Brasil**

Corresponding author: Edsandra C. Chagas, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, **Brasil**. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anestésico dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (OEAT), *Lippia sidoides* (OELS) e *Mentha piperita* (OEMP) para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com base no comportamento de natação dos peixes e possíveis danos histopatológicos nas brânquias. Para indução anestésica, juvenis de tambaqui ( $130,55 \pm 22,4$  g,  $16,8 \pm 0,95$  cm) foram individualmente expostos a diferentes concentrações dos óleos essenciais (OEAT: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ; OELS: 2, 5, 10, 20, 30, 40 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ; OEMP: 5, 10, 20, 40, 60, 70 e  $90 \text{ mg L}^{-1}$ ), num período entre quatro minutos a seis horas de exposição. Os três óleos essenciais avaliados apresentaram propriedades anestésicas. Os intervalos de concentração em que os peixes alcançaram todos os estágios de anestesia (1, 2, 3a, 3b e 4) foram entre 40 a  $150 \text{ mg L}^{-1}$  para OEAT, 20 a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para OELS e 40 a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  para OEMP, sendo o tempo de alcance dos estágios de anestesia inversamente proporcional ao aumento das concentrações dos óleos essenciais. Os danos histopatológicos nas brânquias dos tambaquis, decorrentes do emprego das concentrações dos óleos essenciais definidas como anestésicas ( $150 \text{ mg L}^{-1}$  OEAT,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  OELS,  $90 \text{ mg L}^{-1}$  OEMP), foram avaliados e os principais danos registrados foram: hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, fusão lamelar e proliferação das células de cloreto. De acordo com o índice de alteração histopatológica (IAH), os danos observados com emprego do OELS e OEMP foram de leves a moderados e com OEAT houve registros de danos moderados a severos, mas estes não comprometem o funcionamento do órgão. Portanto, os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* apresentaram eficiência quanto ao seu potencial anestésico para tambaquis.

*Keywords:* anestésico natural, óleos essenciais, tambaqui, piscicultura.

## 1. Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie que ocorre naturalmente nas bacias do Rio Amazonas e Rio Orinoco, é a segunda espécie de peixe mais produzida no Brasil, devido a fácil obtenção de juvenis, rápido crescimento, bem como sua adaptação fisiológica e anatômica aos ambientes com baixa concentração de oxigênio (Saint-Paul, 2017; IBGE, 2018). Com o crescimento da produção, houve maior intensificação nos sistemas de produção, principalmente pelo emprego de altas densidades de estocagem. Esse adensamento somado às práticas de manejo (manuseio, transporte, biometrias, entre outras) empregadas de forma inadequada podem ter efeitos deletérios ao sistema imunológico dos peixes, que podem culminar na mortalidade dos animais (Valladão et al., 2016; Tavares-Dias & Martins, 2017).

Neste contexto, o uso de anestésicos em sistemas de criação tornou-se uma prática importante para o sucesso da aquicultura, visando favorecer o bem-estar dos animais durante e após as práticas de manejo (Barbas et al., 2017; Bianchini et al., 2017; Park et al., 2017; Teixeira et al., 2017; Hoseini et al., 2019). Alguns anestésicos avaliados para peixes que se encontram no mercado são metanossulfonato de triclaína (MS-222), quinaldina, etomidato, metomidato, benzocaína, barbitúricos e propofol (Davis & Griffin, 2004; Valentim et al., 2016; Berlinsky et al., 2016; Bolasina et al., 2017; Readman et al., 2017; Souza et al., 2019; Uehara et al., 2019). Entretanto, efeitos indesejáveis decorrentes do uso desses anestésicos já foram relatados para peixes, tais como depressão da função cardiovascular e respiratória, aumento do lactato, níveis elevados de catecolaminas e inibição da síntese de cortisol (Carter et al., 2011; Zahl et al., 2012).

Durante o processo anestésico são usados vários tipos de agentes sintéticos e naturais. Entretanto, o anestésico ideal deve produzir anestesia rápida (1 a 5min) e recuperação rápida (<10min), ser barato, prático de usar, solúvel em água e não deixar resíduos em peixes, humanos ou no meio ambiente (Park et al., 2017; Bolasina et al., 2017; Purbosari et al., 2019). Na aquicultura, tais características têm sido investigadas em produtos extraídos das plantas, em especial os óleos essenciais (Boijink et al., 2016; Baldisserotto et al., 2018; Batista et al., 2018; Souza et al., 2019).

O óleo essencial de espécies de plantas da família Verbenaceae tem sido avaliado quanto às suas atividades biológicas, dentre as espécies desta família destacamos *Aloysia triphylla*, produzida em toda a América do Sul, que exibe em seu óleo essencial os compostos limoneno,  $\beta$ -citral,  $\alpha$ -citral, espatulenol e óxido de cariofileno (Santos-Gomes et al., 2005; Prochnow et al., 2017), cujo óleo foi avaliado como anestésico e antioxidante em *Rhamdia quelen* (Parodi et al., 2014; Santos et al., 2017) e em *Danio rerio* (Bandeira Junior et al., 2018).

Outra espécie da família Verbenaceae é a *Lippia sidoides*, nativa da região Nordeste do Brasil e norte do estado de Minas Gerais, sendo os constituintes timol e carvacrol os compostos majoritários de seu óleo (Fontenelle et al., 2007; Morais et al., 2012), com atividade anestésica descritas em peixes como *R. quelen* e *Piaractus mesopotamicus* (Silva et al., 2013; Ventura et al., 2019). Outra família que merece destaque é a Lamiaceae, sendo a espécie *Mentha piperita* muito estudada dentro deste gênero, é uma planta naturalizada, não endêmica do Brasil, mas cultivada em grande parte do território brasileiro (Lorenzi & Matos, 2008). Os componentes majoritários deste óleo são mentol, mentona, mentofurano, 1,8-cineol e acetato de metila (Beigi et al., 2018) e a atividade anestésica de seu óleo essencial assim como de seus compostos isolados foi descrita para *R. quelen* (Spanghero et al., 2019), *C. macropomum* (Facanha & Gomes, 2005), *Salminus brasiliensis* (Pádua et al., 2010), *Oligosarcus argenteus* (Uehara et al., 2019) e *Cyprinus carpio* (Roohi & Imanpoor, 2015; Mazandarani & Hoseini, 2017).

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial anestésico dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com base no comportamento de natação dos peixes e possíveis danos histopatológicos nas brânquias.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Plantas, extração e caracterização química dos óleos essenciais

As plantas *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* foram cultivadas na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). Para extração dos óleos essenciais, as folhas e inflorescências das plantas foram coletadas (Registro de acesso ao patrimônio genético - AB13781) e secas a sombra até atingirem peso constante. No Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica o óleo essencial das folhas e inflorescências foi extraído pelo processo de hidrodestilação por duas horas em aparelho de Clevenger. As amostras dos óleos essenciais obtidas foram armazenadas para realização dos ensaios de atividade anestésica, assim como para determinação de sua composição química por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Tabela 1).

### 2.2. Animais

Juvenis de tambaqui ( $130,55 \pm 22,4$  g,  $16,8 \pm 0,95$  cm) foram adquiridos de fazenda comercial (Rio Preto da Eva, AM, Brasil). Os peixes foram aclimatados em tanques de 1000 L

com recirculação de água e aeração constante na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM, Brazil), durante 30 dias. Neste período, os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes onívoros contendo 32% de proteína bruta, duas vezes ao dia até a saciedade aparente.

Os parâmetros de qualidade de água como temperatura ( $28,7 \pm 0,5$  °C), oxigênio dissolvido ( $6,3 \pm 0,3$  mg L<sup>-1</sup>) e pH ( $7,4 \pm 0,5$ ) foram monitorados com uso de oxímetro digital (YSI Pro20, YSI Inc., USA) e pHmetro digital (YSI F-1100, YSI Inc., USA). Os valores de alcalinidade ( $17,2 \pm 3,3$  mg L<sup>-1</sup>) e amônia total ( $0,76 \pm 0,1$  mg L<sup>-1</sup>) foram obtidos por titulação e pelo método de endofenol, respectivamente (APHA, 1998).

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (03/2017).

### 2.3. Indução anestésica e recuperação

Para indução anestésica, os peixes foram expostos a diferentes concentrações dos três óleos essenciais selecionados, a saber: óleo essencial de *Aloysia triphylla* (OEAT) (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 150 mg L<sup>-1</sup>), óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS) (2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg L<sup>-1</sup>) e óleo essencial de *Mentha piperita* (OEMP) (5, 10, 20, 40, 60, 70 e 90 mg L<sup>-1</sup>), que foram estabelecidas com base na literatura e testes preliminares, sendo os OE diluídos em etanol (1:10). Nos ensaios foram utilizados 10 peixes para cada concentração de OE avaliada e os peixes foram utilizados apenas uma vez. A indução anestésica foi realizada em aquários de 10 L e a recuperação em tanques de 310 L.

O tempo de indução anestésica (em segundos) foi registrado de acordo com os estágios anestésicos estabelecidos por Schoettger & Julin (1967), a saber: Estágio 1- sedação leve: perda parcial da reação aos estímulos externos; Estágio 2 - sedação profunda: perda parcial do equilíbrio, nenhuma reação aos estímulos externos; Estágio 3a - perda total do equilíbrio: os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação; Estágio 3b - perda total do equilíbrio: a habilidade da natação para, mas responde à pressão no pedúnculo caudal, Estágio 4 - anestesia: perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos. Após a indução anestésica, os peixes foram transferidos para tanques sem anestésico para avaliar o tempo de recuperação dos peixes (em segundos), que foi caracterizado pelo retorno ao nado normal e reação a estímulos externos.

#### 2.4. Análise histopatológica

Após exposição às concentrações dos óleos essenciais definidas como anestésicas (150 mg L<sup>-1</sup> OEAT, 30 mg L<sup>-1</sup> OELS e 90 mg L<sup>-1</sup> OEMP), seis peixes foram coletados por tratamento para análise histopatológica das brânquias. Para isso, os peixes foram anestesiados e sacrificados por punção craniana (CONCEA, 2018), e os arcos branquiais foram coletados e fixados em formaldeído a 5% tamponado, desidratados em uma série crescente de etanol e diafanizados em xilol. Duas seções de 5 µm foram obtidas de cada amostra (n = 36 seções) e coradas com H&E (Bancroft and Gamble, 2008). Para as análises microscópicas e obtenção de imagens foi utilizado um microscópio óptico (Leica, modelo DM 500). As imagens foram utilizadas para avaliação semiquantitativa dos danos branquiais e os seguintes eventos foram registrados para cada tratamento: estágio I (órgão não comprometido), estágio II (danos moderados que comprometem a função normal dos órgãos) e estágio III (danos muito graves e irreversíveis). Em seguida, foi calculado um valor de IAH (Índice de Alteração Histológica) para cada amostra, usando a fórmula  $IAH = 100 \Sigma I + 101 \Sigma II + 102 \Sigma III$ , sendo I, II e III os estágios classificatórios para alteração tecidual, e os valores obtidos foram interpretados de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

#### 2.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. A avaliação da atividade anestésica foi realizada por análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey (p < 0,05), sendo complementarmente empregada a análise de regressão linear (concentração x tempo de indução anestésica; concentração x tempo de recuperação). A homogeneidade das variâncias dos dados do IAH foi analisada pelo teste de Levene, e não sendo homocedásticos foram submetidos a Kruskal-Wallis ANOVA (p < 0,05).

### 3. Resultados

Os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* apresentaram atividade sedativa e anestésica para *C. macropomum* (Tabelas 2, 3 e 4). Para todos os três óleos essenciais avaliados o padrão de indução anestésica foi similar, pois quanto maior a concentração de óleo utilizada menor o tempo de indução anestésica, e o padrão inverso foi observado para a recuperação dos animais (Figura 1A, B e C). Durante os testes de indução e recuperação anestésica não foi observada nenhuma mortalidade dos tambaquis.

Com o emprego do OEAT nas concentrações de 5 a 20 mg L<sup>-1</sup> não foi possível alcançar todas as fases de anestesia (somente até o estágio 3a), porém nas concentrações de 40 a 150 mg L<sup>-1</sup>, todos os estágios de anestesia foram alcançados e houve recuperação dos animais, com diferença estatística entre os tratamentos, em ambos os estágios (anestesia e recuperação) (Tabela 2).

Com o OELS na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> os peixes não transpuseram o estágio 2 de indução anestésica, quando comparada às demais concentrações avaliadas. Nas concentrações de 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> os peixes alcançaram até o estágio 3a. Já para as concentrações de 20 a 50 mg L<sup>-1</sup> os peixes alcançaram todos os estágios de anestesia, e neste caso o tempo de alcance dos estágios foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações. O estágio de anestesia (estágio 4) foi alcançado em tempo inferior a 5 minutos nas concentrações de 30 a 50 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3). Quanto ao tempo de recuperação, todas as concentrações testadas diferiram entre si (Tabela 3).

Com o OEMP observou-se que, com o intervalo de concentrações entre 5 a 20 mg L<sup>-1</sup>, não foi possível alcançar todos os estágios de anestesia, somente até o estágio 3a (Tabela 4). Para as concentrações de 40 a 90 mg L<sup>-1</sup> foram alcançados até o estágio 4, sendo que para estas concentrações a partir do estágio 3a o tempo necessário para o alcance dos estágios foi estatisticamente diferente e inversamente proporcional ao aumento das concentrações (Tabela 4). Houve diferença significativa no tempo de recuperação dos animais na concentração de 90 mg L<sup>-1</sup> em relação às demais (Tabela 4).

Com relação à avaliação histopatológica, os danos mais frequentemente registrados nas brânquias de tambaquis pertencentes aos tratamentos com óleo essencial de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* foram: hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, fusão lamelar e proliferação das células de cloreto (Tabela 5; Figura 2). Quanto aos valores médios estimados para o índice de alteração histopatológica (IAH) não houve diferença entre os tratamentos (Figura 3). De acordo com a escala de classificação de dano de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), os valores de IAH obtidos neste estudo situam-se entre 0 a 10 para *M. piperita* indicando a ocorrência de funcionamento normal do órgão, 0 a 20 para *L. sidoides* com danos médios a moderados, que não comprometem o funcionamento do órgão e entre 0 a 50 para *A. triphylla* com registros de danos moderados a severos (Tabela 6).

#### 4. Discussão

Anestésicos têm sido utilizados na aquicultura durante as operações de manejo e transporte dos peixes para facilitar o manuseio dos mesmos e manutenção de seu bem-estar (Park

et al., 2017; Teixeira et al., 2017; Hoseini et al., 2019). Entretanto, nos últimos anos em razão de alguns efeitos indesejáveis dos anestésicos sintéticos, a busca por novas moléculas tem sido estimulada e os estudos com anestésicos naturais como os óleos essenciais e extratos de plantas têm sido priorizados (Boijink et al., 2016; Baldisserotto et al., 2018; Batista et al., 2018; Souza et al., 2019).

Todos os óleos essenciais avaliados neste estudo (*A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita*) apresentaram efeito sedativo e anestésico em tambaqui. À medida que foram aumentadas as concentrações dos óleos essenciais, os tempos de indução anestésica foram diminuindo. Na recuperação, observou-se um efeito contrário ao da indução anestésica, pois quanto maior a concentração, maior foi o tempo de retorno da atividade natatória dos peixes. Resultados semelhantes de indução e recuperação anestésica foram observados em espécies de peixes como *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e *R. quelen*, com emprego dos óleos essenciais de *A. triphylla* (Santos et al., 2017), *Lippia alba*, *L. sidoides* e *L. origanoides* (Batista et al., 2018; Silva et al., 2019; Ventura et al., 2019), *M. piperita* (Spanghero et al., 2019), *Ocimum gratissimum* (Boijink et al., 2016), *Aniba rosaedora* e *Aniba parviflora* (Baldisserotto et al., 2018).

No presente estudo, somente nas concentrações do OEAT de 40 a 150 mg L<sup>-1</sup> que os tambaquis alcançaram todos estágios de anestesia. O tempo médio de anestesia variou de 1595,7 a 283,5 segundos (26,6 a 4,7 minutos) e a recuperação foi de 459,9 a 663,6 segundos (7,7 a 11,1 minutos). Considerando o critério para escolha de anestésicos de que este produto deve produzir anestesia rápida (1 a 5min) e recuperação rápida (< 10 min) (Purbosari et al., 2019), os resultados obtidos para o tambaqui ficaram próximos deste padrão, pois na maior concentração de OEAT avaliada (150 mg L<sup>-1</sup>) os tambaquis alcançaram a anestesia em 4,7 minutos, mas com tempo de recuperação de 11,1 minutos, sem ocorrência de mortalidades, o que está de acordo com o estudo de Parodi et al. (2014) que definiu a concentração anestésica de *A. triphylla* para *R. quelen* em 200 µL L<sup>-1</sup> (180 mg L<sup>-1</sup>) em função do tempo de anestesia (5,35 minutos). A ação anestésica do OEAT obtida com os tambaquis pode ser atribuída aos compostos majoritários de seu óleo como β-pineno (22,0 %), *trans*-pinocanfona (13,1 %), acetato de *trans*-pinocarvila (7,6%), guaiol (5,3%), óxido de cariofileno (3,0%), entre outros componentes em menores proporções. Prochnow et al. (2017) relata a variação nos componentes deste óleo essencial em função da sazonalidade, pois o óxido de cariofileno variou de 2,3 a 7,2% e β-pineno variou de 0,3 a 0,4%. Esta constatação também foi relatada por Sgarbossa et al. (2019), cujos componentes majoritários do OEAT foram α-citral, limoneno e β-citral, sendo os maiores níveis observados no inverno. A atividade anestésica deste óleo essencial está relacionada à ação de seus compostos

sobre os neurônios entéricos, os quais secretam mais de dez neurotransmissores excitatórios e inibitórios, como a acetilcolina (Grundy & Schemann, 2006).

Com o emprego do OELS os tambaquis atingiram o estágio de anestesia (perda da atividade reflexa, sem reação aos estímulos externos) nas concentrações de 20 a 50 mg L<sup>-1</sup> no tempo de 431,1 a 211,6 segundos (7,2 - 3,5 minutos). Portanto, a concentração anestésica adequada para o tambaqui foi estabelecida em 30 mg L<sup>-1</sup>, em função do tempo de anestesia de 270,9 segundos (4,5 minutos) e recuperação em 590,1 segundos (9,8 minutos), sendo o OELS composto principalmente por timol (72,2%), p-cimeno (8,1%) e (E)-cariofileno (4,9%). Comparado a outras espécies de peixes como *R. quelen*, o tambaqui se mostrou mais sensível ao óleo essencial, pois o tempo de indução anestésica dos jundiás foi de 11 a 20 minutos com emprego de concentrações entre 150 a 600 µL L<sup>-1</sup> de dois quimiotipos do OELS (timol e carvacrol, com 68,40% e 67,89%, respectivamente), sem haver a recuperação dos peixes após 30 minutos de observação (Silva et al., 2013). Já para *P. mesopotamicus* concentrações entre 20 e 70 mg L<sup>-1</sup> OELS foram eficientes em induzir a anestesia nesta espécie, sem causar mortalidade (Ventura et al., 2019). Outro óleo essencial que tem como constituintes majoritários o carvacrol (47,2%) e o timol (12,8%) é a espécie *Lippia organoides*, com atividade sedativa e anestésica descrita para o jundiá, sendo este óleo recomendado para uso no transporte de jundiás por manter a frequência ventilatória constante, evitando estresse metabólico (Becker et al., 2018). No caso do OELS avaliado neste estudo ser constituído principalmente por timol (72,2%), a ele é atribuído o efeito anestésico, bem como ao efeito sinérgico com outros compostos em menor proporção como o carvacrol (0,9%) (Tabela 1). Segundo Tamura e Iwamoto (2004), o timol possui ação sobre a miosina do músculo esquelético potencializando a atividade ATPase, reduzindo os parâmetros de cinética da contração.

Para o OEMP, a menor concentração avaliada (5 mg L<sup>-1</sup>) foi responsável por atingir a sedação profunda dos tambaquis, com 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> foi alcançada a perda total de equilíbrio, mas a anestesia dos peixes só foi atingida com concentrações a partir de 40 mg L<sup>-1</sup>, sendo que o tempo de indução anestésica variou de 825,3 a 275,0 segundos (13,8 a 4,6 minutos), apresentando diferença estatística entre os tratamentos, cuja diferença também foi observada quanto aos tempos de recuperação anestésica que variaram de 696,8 a 841,2 segundos (8,9 a 14,0 minutos). Para juvenis de *R. quelen* o OEMP foi considerado um anestésico eficiente na concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, com reduzido tempo de anestesia (<4min) e de recuperação (<10 min), sem mortalidade (Spanghero et al., 2019). Em ambos os estudos o composto majoritário do óleo foi o mentol (33,8% no ensaio com tambaqui e 27,5% no ensaio com jundiá). Com o composto isolado mentol, Façanha & Gomes (2005) induziram a anestesia de tambaquis com

concentrações de 50-250 mg L<sup>-1</sup> com o tempo de 358 a 105 segundos (5,97 a 1,76 minutos), cujo tempo de indução foi menor do que o alcançado neste estudo com o OEMP. Para *S. brasiliensis*, todas as concentrações de mentol avaliadas (60, 90, 120 e 150 mg L<sup>-1</sup>) induziu a anestesia, sem ocorrência de mortalidade, sendo a concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> estabelecida como adequada para a indução e recuperação anestésica da espécie (Pádua et al., 2010). De forma semelhante, para a espécie *Oligosarcus argenteus* todas as concentrações de mentol (25, 50, 75, 100 e 125 mg L<sup>-1</sup>) foram eficientes para indução da anestesia profunda, com os tempos variando de 8,38 a 1,09 minutos (Uehara et al., 2019). A ação anestésica do mentol está relacionada, em parte, com a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (Watt et al., 2008).

Quanto aos aspectos histológicos de brânquias, sabe-se que, devido a imposição de condições estressantes para os peixes durante o manejo, o tecido branquial pode sofrer alterações para se adaptar à nova condição (Nilsson, 2007). Alterações morfológicas podem indicar o desenvolvimento de estratégias adaptativas de peixes para a proteção de importantes funções fisiológicas, incluindo trocas gasosas, equilíbrio ácido-base, osmorregulação e excreção de compostos nitrogenados (Barbieri & Bondioli, 2015). No presente estudo, nenhum dano irreversível tais como fibrose ou necrose focal foi observado no tecido branquial dos tambaquis, decorrentes do emprego das concentrações dos óleos essenciais definidas como anestésicas (150 mg L<sup>-1</sup> OEAT, 30 mg L<sup>-1</sup> OELS, 90 mg L<sup>-1</sup> OEMP), não sendo também relatado danos irreversíveis em outros estudos com emprego dos óleos essenciais de *L. alba* para o tambaqui e *M. piperita* para o jundiá, assim como do composto isolado eugenol para o peixe de água doce angelfish (*Pterophyllum scalare*), mesmo com tempo prologado de exposição (Maia et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Spanghero et al., 2019).

A hipertrofia e hiperplasia epitelial lamelar observada no epitélio que cobre as lamelas secundárias dos tambaquis, no presente estudo, é considerada uma resposta comum e inespecífica a danos branquiais subagudos a crônicos (Strzyzewska et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Considerando que estas respostas celulares estão entre os mecanismos de primeira defesa e são classificados como leves e reparáveis (Raskovic et al., 2010), a exposição do tambaqui aos óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* nas concentrações estabelecidas como anestésicas para o tambaqui não comprometeu o funcionamento normal de suas brânquias.

Os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* apresentaram eficiência quanto ao seu potencial anestésico, com tempo de indução anestésica abaixo de 5 minutos. Ressalta-se que apesar dos óleos essenciais de *A. triphylla* e *M. piperita* tenham apresentado tempo de recuperação acima do tempo estabelecido como critério para escolha de anestésicos,

que é de 10 minutos, estes animais se recuperaram em 11,1 e 14,0 minutos, respectivamente, e não houve mortalidade destes animais em até 30 dias após a indução anestésica. Portanto, estes três óleos essenciais podem ser utilizados como anestésicos para o tambaqui. Adicionalmente, sugere-se que outros estudos sejam conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial sedativo destes óleos essenciais na redução do estresse provocado durante o protocolo de transporte de peixes

## Conclusão

Os óleos essenciais de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita* são eficientes como sedativos e anestésicos em tambaqui. Destes, o óleo essencial de *L. sidoides* (30 mg L<sup>-1</sup>) foi o que apresentou maior eficiência quanto ao potencial anestésico, com menor tempo de indução e de recuperação anestésica (4,52 e 9,84 minutos, respectivamente). Quando do emprego das concentrações anestésicas dos óleos essenciais (*A. triphylla* 150 mg L<sup>-1</sup>, *L. sidoides* 30 mg L<sup>-1</sup> e *M. piperita* 90 mg L<sup>-1</sup>), não foram registrados danos irreversíveis nas brânquias dos tambaquis, como fibrose e necrose.

## Agradecimentos

À Embrapa (MP2 - 02.12.01.020.00.00) pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo concedida a F.R. Brandão. Às professoras Flávia Kelly Souza e Cristhiana Röpke do curso de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (CIPET/UFAM) pelas sugestões para o manuscrito. Aos assistentes Edson Paiva Afonso e José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo auxílio nas coletas dos peixes.

## Referências

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation. Washington DC.
- Baldisserotto, B., Barata, L.E.S., Silva, A.S., Lobato, W.F.F., Silva, L.L., Toni, C., Silva, L.V.F., 2018. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. Neotrop. Ichthyol. 16, 1-170128.

- Bancroft, J.D., Gamble, M., 2008. Theory and practice of histological techniques. Elsevier health sciences.
- Bandeira Junior, G., de Abreu, M.S., da Rosa, J.G. dos S., Pinheiro, C.G., Heinzmann, B.M., Caron, B.O., Baldisserotto, B., Barcellos, L.J.G., 2018. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. *Aquaculture* 482, 49–56.
- Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., de Oliveira Garcia, L., Monserrat, J.M., da Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2017. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469, 79–87.
- Batista, E. S., Brandão, F.R., Majolo, C., Inoue, L.A.K.A., Maciel, P.O., de Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture* 495, 545–549.
- Becker, A.J., Fogliarini, C. de O., Souza, C. de F., Becker, A.G., Mourão, R.H.V., Silva, L.V.F. da, Baldisserotto, B., 2018. Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: a comparative approach between different essential oils. *Rev. Bras. Zootec.* 47, e20170185.
- Beigi, M., Toriki-Harchegani, M., Ghasemi Pirbalouti, A., 2018. Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha × piperita* L.) leaves under different drying methods. *Int. J. food Prop.* 21, 267–276.
- Berlinsky, D.L., Watson, M.T., DiMaggio, M.A., Breton, T.S., 2016. The use of tricaine methanesulfonate, clove oil, metomidate, and 2-phenoxyethanol for anesthesia induction in alewives. *N. Am. J. Aquac.* 78, 84–91.
- Bianchini, A.E., Garlet, Q.I., da Cunha, J.A., Bandeira Junior, G., Brusque, I.C.M., Salbego, J., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 50, e6346.
- Boijink, C. L., Queiroz, C.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A., 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture* 457, 24–28.
- 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*. *Aquac. Reports* 6, 56–60.
- Carter, K.M., Woodley, C.M., Brown, R.S., 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev. fish Biol. Fish.* 21, 51–59.

- CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2018. Diretriz Da Prática Eutanásia Em Animais Incluídos Em Atividades Ensino Ou Pesquisa Científica. [https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia\\_site-concea.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf) (accessed may 20 2019).
- Davis, K.B., Griffin, B.R., 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. *Aquaculture* 233, 531–548.
- Façanha, M.F., Gomes, L. de C., 2005. Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amaz.* 35, 71–75.
- Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrim, J.J.C., 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 934–940.
- Grundt, D., Schemann, M., 2006. Enteric nervous system. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 102–110.
- Hoseini, S.M., Taheri Mirghaed, A., Yousefi, M., 2019. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Rev. Aquac.* 11, 550–564.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: [s.n.]. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>.
- Lorenzi, H., Matos, F.J., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.
- 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.
- Morais, S.R. de, Oliveira, T.L.S., Bara, M.T.F., Conceição, E.C. da, Rezende, M.H., Ferri, P.H., Paula, J.R., 2012. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. *Int. J. Anal. Chem.* 2012.
- Pádua, S.B., Pietro, P.S., Igléssias-Filho, P.S., Ishikawa, M.M., Hisano, H., 2018. Mentol como anestésico para dourado, (*Salminus brasiliensis*). *Bol. do Inst. Pesca* 36, 143–148.
- Park, I.-S., Gil, H.W., Lee, T.H., Nam, Y.K., Lim, S.G., Kim, D.S., 2017. Effects of clove oil and lidocaine-HCl anesthesia on water parameter during simulated transportation in the marine medaka, *Oryzias dancena*. *Dev. Reprod.* 21, 19-33.
- Parodi, T. V, Cunha, M.A., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Martins, D.I., Koakoski, G., Barcellos, L.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2014. Anesthetic activity of the

- essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 323–334.
- Poleksić, V., Mitrović-Tutundžić, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal chronic Eff. Pollut. Freshw. fish.* Oxford Fish. News Books 339–352.
- Prochnow, D., Altissimo, B.S., da Silva, J.C., Meira, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Schmid, D., 2017. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* 16, 122–129.
- Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., Santoso, J., 2019. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquac. Fish.* 4, 129–133.
- Readman, G.D., Owen, S.F., Knowles, T.G., Murrell, J.C., 2017. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. *Sci. Rep.* 7, 7102.
- Roohi, Z., Imanpoor, M.R., 2015. The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. *Aquaculture* 437, 327–332.
- Saint-Paul, U., 2017. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta Fish. Aquat. Resour.* 5, 1–9.
- Santos, A.C., Junior, G.B., Zago, D.C., Zeppenfeld, C.C., da Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., da Cunha, M.A., 2017. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.* 44, 106–113.
- Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira, M., Vicente, A.M.S., 2005. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. *J. Essent. Oil Res.* 17, 73–78.
- Schoettger, R.A., Julin, A.M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. US Fish and Wildlife Service.
- Sgarbossa, J., Schmidt, D., Schwerz, F., Schwerz, L., Prochnow, D., Caron, B.O., 2019. Effect of season and irrigation on the chemical composition of *Aloysia triphylla* essential oil. *Rev. Ceres* 66, 85–93.
- Silva, H.N.P. da, Carvalho, B.C.F. de, Maia, J.L. dos S., Becker, A.G., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Mourão, R.H.V., Silva, L.V.F. da, 2019. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia organoides* in Tambaqui juveniles. *Ciênc. Rural* 49,

e20181059.

- Silva, L. de L., Silva, D.T. da, Garlet, Q.I., Cunha, M.A., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.M., 2013. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotrop. Ichthyol.* 11, 443–451.
- Souza, A. da S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., de Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: Implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169.
- Spanghero, D.B.N., Spanghero, E.C.A. de M., Pedron, J. Dos S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Zaniboni-Filho, E., 2019. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesq. Agropec. Bras.* 54, e00367.
- Tamura, T., Iwamoto, H., 2004. Thymol: a classical small-molecule compound that has a dual effect (potentiating and inhibitory) on myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 786–791.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., 2017. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J. Parasit. Dis.* 41, 913–918.
- Teixeira, R.R., de Souza, R.C., Sena, A.C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Couto, R.D., Copatti, C.E., 2017. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquac. Res.* 48, 3383–3392.
- Uehara, S.A., Andrade, D.R., Takata, R., Júnior, A.V.G., Vidal, M. V., 2019. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. *Aquaculture* 502, 326–331.
- Valentim, A.M., Félix, L.M., Carvalho, L., Diniz, E., Antunes, L.M., 2016. A new anaesthetic protocol for adult zebrafish (*Danio rerio*): propofol combined with lidocaine. *PLoS One* 11, e0147747.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquac.* 10, 351–369.
- Ventura, A.S., de Castro Silva, T.S., Zanon, R.B., Inoue, L.A.K.A., Cardoso, C.A.L., 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *Int. Aquat. Res.* 11, 1–12.
- Watt, E.E., Betts, B.A., Kotey, F.O., Humbert, D.J., Griffith, T.N., Kelly, E.W., Veneskey, K.C., Gill, N., Rowan, K.C., Jenkins, A., 2008. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. *Eur. J.*

Pharmacol. 590, 120–126.

Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 201–218.

**Tabela 1.** Compostos majoritários dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*.

<b>Óleo essencial</b>	<b>Compostos</b>	<b>%</b>	<b>IR<sup>a</sup></b>
<i>Aloysia triphylla</i>	$\beta$ -pineno	22,0	974
	<i>trans</i> -pinocanfona	13,1	1158
	acetato de <i>trans</i> -pinocarvila	7,6	1298
	óxido de cariofileno	3,0	1582
	guaiol	5,3	1600
<i>Lippia sidoides</i>	mirreno	1,5	988
	<i>p</i> -cimeno	8,1	1022
	$\gamma$ -terpineno	2,2	1054
	timol	72,2	1289
	( <i>E</i> )-cariofileno	4,9	1417
	óxido de cariofileno	1,3	1582
<i>Mentha piperita</i>	$\alpha$ -pineno	1,0	932
	canfeno	1,3	946
	limoneno	4,7	1024
	mentona	15,2	1148
	mentol	33,8	1167
	pulegona	8,3	1233
	acetato de metila	13,0	1294

<sup>a</sup> Índice de Retenção no HP-5.

**Tabela 2.** Tempo necessário para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) atingirem os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de *Aloysia triphylla*.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Tempos de indução anestésica (segundos)					
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3A	Estágio 3B	Estágio 4	Recuperação
5	106,6 ± 10,9 <sup>a</sup>	231,0 ± 51,2 <sup>a</sup>	-	-	-	-
10	56,9 ± 6,3 <sup>b</sup>	214,7 ± 24,4 <sup>a</sup>	750,0 ± 57,7 <sup>a</sup>	-	-	-
20	47,6 ± 5,3 <sup>b</sup>	147,0 ± 16,5 <sup>b</sup>	590,5 ± 28,6 <sup>ab</sup>	-	-	-
40	28,7 ± 4,9 <sup>c</sup>	78,2 ± 7,7 <sup>c</sup>	327,3 ± 28,2 <sup>c</sup>	874,6 ± 34,9 <sup>a</sup>	1595,7 ± 67,6 <sup>a</sup>	459,9 ± 14,4 <sup>a</sup>
60	21,1 ± 3,3 <sup>c</sup>	48,3 ± 7,8 <sup>d</sup>	231,9 ± 22,6 <sup>d</sup>	480,3 ± 42,9 <sup>b</sup>	751,8 ± 48,6 <sup>b</sup>	511,6 ± 42,5 <sup>a</sup>
80	24,0 ± 3,8 <sup>c</sup>	79,6 ± 20,1 <sup>c</sup>	282,8 ± 60,4 <sup>de</sup>	479,6 ± 30,7 <sup>b</sup>	579,0 ± 68,7 <sup>b</sup>	520,6 ± 53,9 <sup>a</sup>
150	17,2 ± 0,8 <sup>c</sup>	41,7 ± 7,2 <sup>d</sup>	109,1 ± 19,5 <sup>e</sup>	199,5 ± 15,6 <sup>c</sup>	283,5 ± 28,9 <sup>c</sup>	663,6 ± 24,9 <sup>b</sup>

Os traços denotam ausência de estágio após observação por 6 horas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos determinado por ANOVA e teste de Tukey (p < 0,05).

**Tabela 3.** Tempo necessário para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) atingirem os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de *Lippia sidoides*.

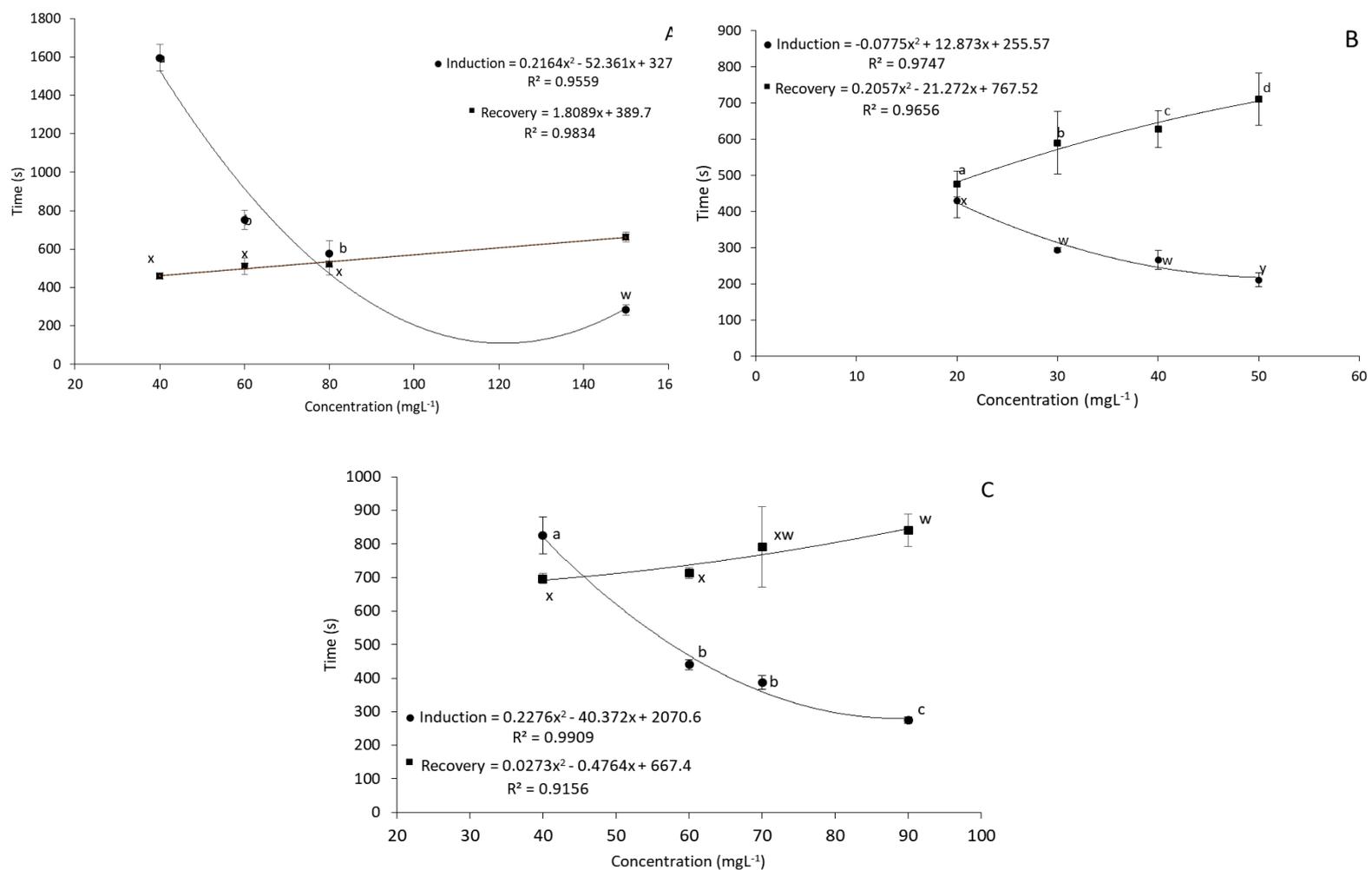
Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Tempos de indução anestésica (segundos)					
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3A	Estágio 3B	Estágio 4	Recuperação
2	27,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	84,6 ± 7,2 <sup>a</sup>	-	-	-	-
5	26,4 ± 1,5 <sup>a</sup>	45,5 ± 1,5 <sup>b</sup>	98,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	-	-	-
10	18,3 ± 2,0 <sup>a</sup>	40,1 ± 2,6 <sup>b</sup>	119,0 ± 14,6 <sup>a</sup>	-	-	-
20	20,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	43,8 ± 2,3 <sup>b</sup>	121,4 ± 6,6 <sup>a</sup>	316,0 ± 7,8 <sup>a</sup>	431,1 ± 17,9 <sup>a</sup>	476,0 ± 11,1 <sup>a</sup>
30	17,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	34,4 ± 1,8 <sup>b</sup>	146,1 ± 5,1 <sup>b</sup>	323,1 ± 6,1 <sup>a</sup>	270,9 ± 6,2 <sup>b</sup>	590,1 ± 27,4 <sup>b</sup>
40	18,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	39,5 ± 3,6 <sup>b</sup>	141,1 ± 4,3 <sup>b</sup>	211,0 ± 6,5 <sup>b</sup>	266,0 ± 8,3 <sup>b</sup>	628,4 ± 15,9 <sup>c</sup>
50	17,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	36,4 ± 2,5 <sup>b</sup>	104,0 ± 9,9 <sup>a</sup>	168,1 ± 6,5 <sup>b</sup>	211,6 ± 6,2 <sup>c</sup>	711,5 ± 22,7 <sup>d</sup>

Os traços denotam ausência de estágio após uma observação de 6 horas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos determinado por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Tempo necessário para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) atingirem os estágios de indução e recuperação anestésica com o óleo essencial de *Mentha piperita*.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Tempos de indução anestésica (segundos)					
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3 A	Estágio 3B	Estágio 4	Recuperação
5	55,7 ± 14,1 <sup>a</sup>	95,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	-	-	-	-
10	29,4 ± 7,05 <sup>b</sup>	92,8 ± 3,6 <sup>ab</sup>	670,1 ± 8,5 <sup>a</sup>	-	-	-
20	29,5 ± 5,4 <sup>b</sup>	73,4 ± 9,6 <sup>ab</sup>	540,9 ± 13,9 <sup>b</sup>	-	-	-
40	33,1 ± 5,1 <sup>b</sup>	78,4 ± 8,5 <sup>abc</sup>	383,7 ± 17,2 <sup>c</sup>	597,4 ± 25,4 <sup>a</sup>	825,3 ± 55,7 <sup>a</sup>	696,8 ± 14,8 <sup>a</sup>
60	17,7 ± 1,4 <sup>c</sup>	78,1 ± 12,2 <sup>bc</sup>	230,5 ± 15,2 <sup>d</sup>	346,8 ± 14,3 <sup>b</sup>	440,1 ± 14,2 <sup>b</sup>	713,6 ± 15,8 <sup>a</sup>
70	19,2 ± 1,6 <sup>c</sup>	47,0 ± 5,1 <sup>d</sup>	100,6 ± 12,4 <sup>e</sup>	235,9 ± 19,3 <sup>c</sup>	387,1 ± 20,7 <sup>b</sup>	791,6 ± 119,5 <sup>ab</sup>
90	17,1 ± 1,4 <sup>c</sup>	43,0 ± 2,1 <sup>d</sup>	94,4 ± 9,9 <sup>e</sup>	181,1 ± 11,2 <sup>c</sup>	275,0 ± 10,3 <sup>c</sup>	841,2 ± 48,9 <sup>b</sup>

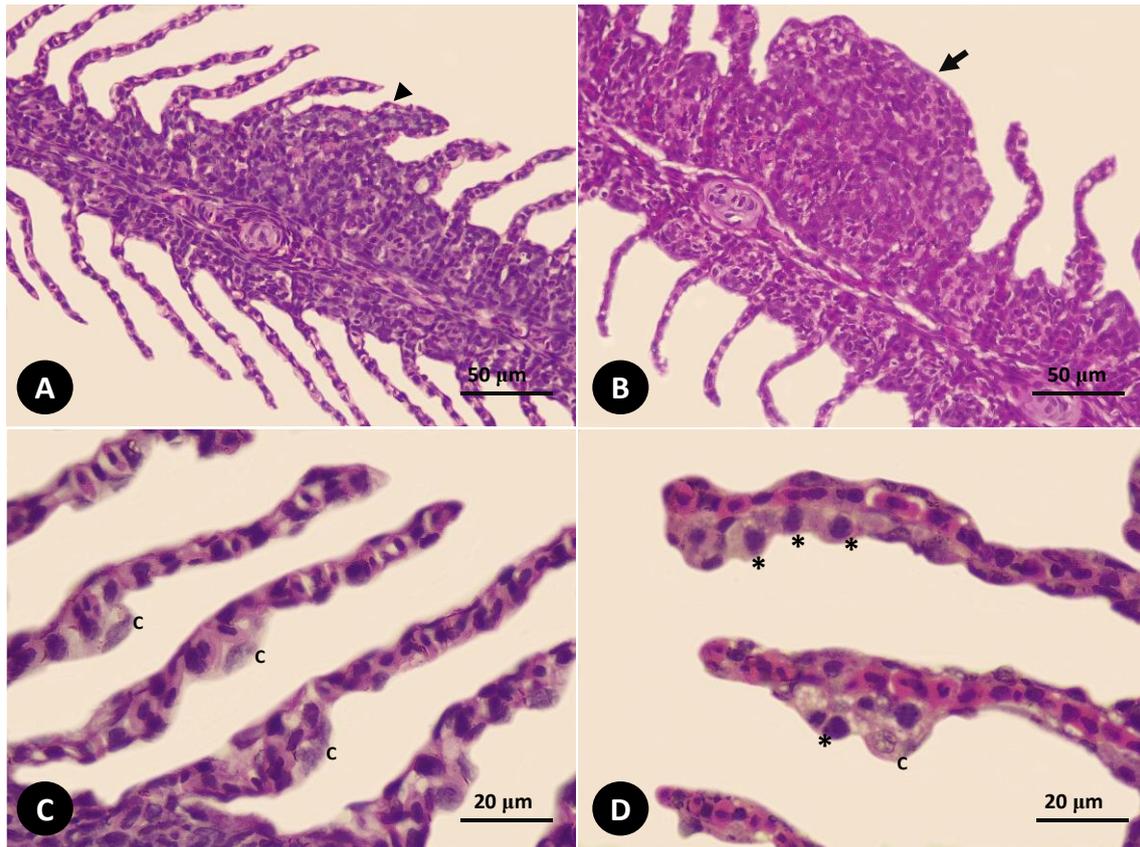
Os traços denotam ausência de estágio após uma observação de 6 horas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos determinado por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



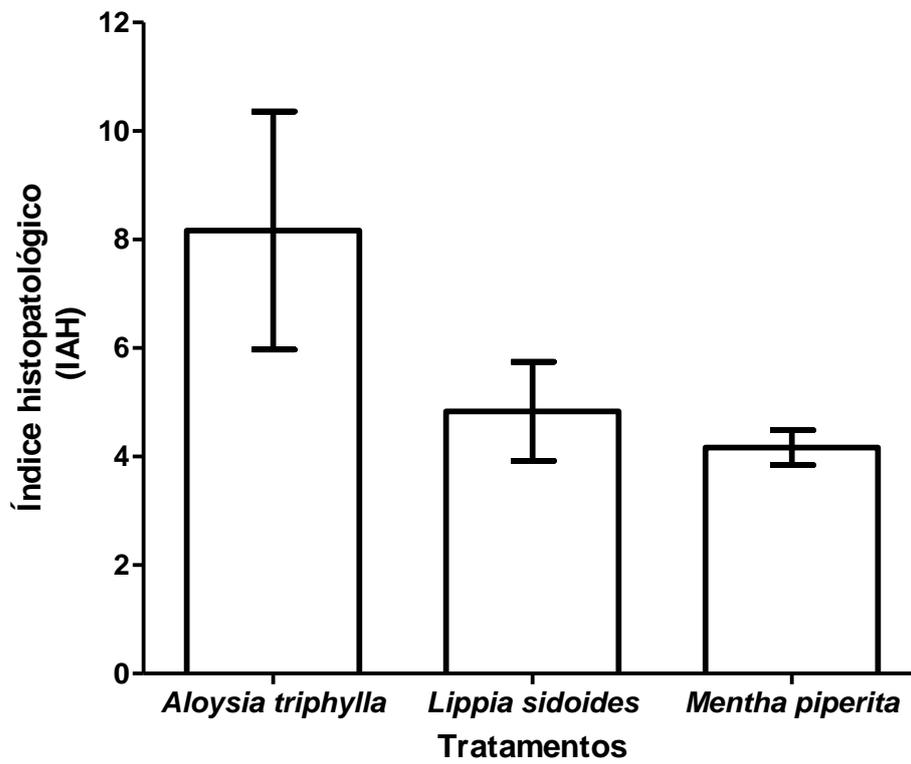
**Figura 1.** Indução e recuperação anestésica de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com emprego de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Aloysia triphylla* (A), *Lippia sidoides* (B) e *Mentha piperita* (C).

**Tabela 5.** Frequência relativa (%) dos danos histopatológicos em brânquias de *Colossoma macropomum*, após indução anestésica com óleo essencial de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*.

Alterações histopatológicas	Grau	Óleos essenciais		
		<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Mentha piperita</i>
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	23,5	29,3	28,6
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	15,7	17,1	19,0
Fusão lamelar	I	15,7	14,6	14,3
Descolamento do epitélio	I	2,0	0,0	2,4
Proliferação de células de cloreto	I	19,6	24,4	23,8
Proliferação de células mucosas	I	13,7	9,8	11,9
Edema	I	2,0	2,0	0,0
Ruptura epitelial (hemorragia)	II	2,0	0,0	0,0
Aneurisma lamelar	II	5,9	2,4	0,0
Necrose	III	0,0	0,0	0,0
Total		100,0	100,0	100,0



**Figura 2.** Alterações histológicas mais frequentes em brânquias de *Collossoma macropomum* após indução anestésica com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*. A – Hiperplasia do epitélio lamelar (cabeça de seta); B – Fusão lamelar (seta); C – Proliferação de células de cloreto (c); D – Hipertrofia do epitélio lamelar (asteriscos) e proliferação das células de cloreto (c).



**Figure 3.** Valores médios do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) em brânquias de *Collossoma macropomum*, após indução anestésica com óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*.

**Table 6.** Frequência relativa (%) do índice de alteração histopatológica (IAH) observado em brânquias de *Colossoma macropomum*, após indução anestésica com óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*.

Escala de IAH	Óleo essencial			Interpretação
	<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Mentha piperita</i>	
0 a 10	75,0	91,7	100,0	Funcionamento normal do órgão
11 a 20	16,7	8,3	0,0	Danos leves a moderados no órgão
21 a 50	8,3	0,0	0,0	Alterações moderadas a severas no órgão
50 a 100	0,0	0,0	0,0	Alterações severas no órgão
> 100	0,0	0,0	0,0	Danos irreparáveis no órgão

## Capítulo III

### **Óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* como redutores de estresse no transporte de *Colossoma macropomum***

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Aquaculture. ISSN  
(eletrônico): 0044-8486.

**Óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* como redutores de estresse no transporte de *Colossoma macropomum***

Franmir Rodrigues Brandão<sup>a</sup>, Wallice Paxiúba Duncan<sup>a,b</sup>, Caio Francisco Santana Farias<sup>c</sup>, Damy Caroline de Melo Souza<sup>a</sup>, Maria Inês Braga de Oliveira<sup>a,b</sup>, Maria Juliete Souza Rocha<sup>a</sup>, Patrícia Castro Monteiro<sup>a</sup>, Cláudia Majolo<sup>d</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>d</sup>, Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan<sup>a,d</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 60077-000, Manaus, AM, **Brasil**

<sup>b</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 60077-000, Manaus, AM, **Brasil**

<sup>c</sup>Uninorte Laureate International Universities, Av. Joaquim Nabuco 1469, Centro, 69020-030, Manaus, AM, **Brasil**

<sup>d</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, AM-010, Km 29, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM, **Brasil**

Corresponding author: Edsandra C. Chagas, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, **Brasil**.

E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br

## Resumo

Este estudo avaliou o uso dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Mentha piperita* (OEMP) como redutor de estresse no transporte de *Colossoma macropomum*. Os peixes ( $127,55 \pm 22,41$  g) foram transportados durante quatro horas em sacos plásticos, compondo os seguintes tratamentos: a) controle não estressado (NE - não submetido ao transporte), b) controle estressado (E - submetido ao transporte), c) OELS  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , d) OELS  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , e) OEMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e f) OEMP  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , com três repetições. Após o transporte foram analisados parâmetros de qualidade de água, hormonais, bioquímicos e enzimáticos. *C. macropomum* transportado com OELS  $20 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou uma redução significativa nos níveis de cortisol se comparado aos peixes transportados sem óleo essencial. A via glicolítica foi especialmente estimulada nos peixes transportados com OEMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , pois os valores das enzimas glicolíticas hexoquinase (HK), piruvato cinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) estavam elevados no tecido muscular. Os óleos essenciais não afetaram a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro de *C. macropomum*, e após o transporte os peixes de todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa (28,2%) da AChE muscular. As concentrações OELS  $20 \text{ mg L}^{-1}$  OEMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$  promoveram aumento dos níveis da enzima glutathione S-transferase (GST) no cérebro. Conclui-se que os óleos essenciais nas concentrações avaliadas tendem a melhorar a qualidade da água durante o transporte, minimizam o estresse fisiológico, ajudam a manter a demanda energética por meio da via glicogênio e, além disso, não demonstram ter efeitos neurotóxicos, recomendada a concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  OELS para uso no transporte de juvenis de *C. macropomum*.

**Palavras chaves:** anestésicos naturais, metabolismo energético, neurotoxicidade, tabaqui.

## Abstract

This study evaluated the use of essential oils of *Lippia sidoides* (EOLS) and *Mentha piperita* (EOMP) as a stress reducer in the transport of *Colossoma macropomum*. The fish ( $127.55 \pm 22.41$  g) were transported for four hours in plastic bags, comprising the following treatments: a) non-stressed control (NS: not subjected to transport), b) stressed control (S: subjected to transport), c) EOLS  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , d) EOLS  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , e) EOMP  $20 \text{ mg L}^{-1}$  and f) EOMP  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , with three repetitions. After transport, water quality, hormonal, biochemical and enzymatic

parameters were analyzed. *C. macropomum* transported with EOLS 20 mg L<sup>-1</sup> showed a significant reduction in the levels of cortisol when compared to fish transported without essential oil. The glycolytic pathway was especially stimulated in fish transported with 20 mg L<sup>-1</sup> of EOMP, since the values of glycolytic enzymes hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were elevated in muscle tissue. Essential oils did not affect the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the brain of *C. macropomum*, and after transport, fish from all treatments showed a significant reduction (28.2%) in muscle AChE. Concentrations of EOLS 20 mg L<sup>-1</sup> and EOMP 20 mg L<sup>-1</sup> promoted an increase in the levels of the enzyme glutathione S-transferase (GST) in the brain. It is concluded that the essential oils in the evaluated concentrations tend to improve the quality of the water during transport, minimize physiological stress, help to maintain the energy demand through the glycogen pathway and, in addition, do not demonstrate to have neurotoxic effects. It is recommended the concentration of 20 mg L<sup>-1</sup> of *Lippia sidoides* essential oil for use in transport of *C. macropomum*.

**Key words:** energy metabolism, natural anesthetics, neurotoxicity, tambaqui.

## 1. Introdução

Na região **Amazônica** o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie de peixe cultivada, devido ao seu rápido de crescimento, alta produtividade em sistemas de produção, entre outros fatores (Saint-Paul, 2017; Valladão et al., 2018). Acompanhando a intensificação dos sistemas de produção da espécie, a busca por práticas de manejo, que auxiliem na redução das respostas de estresse e da mortalidade de peixes no ambiente de cultivo, é crescente. Dentre as práticas de rotina na criação, o transporte de peixes vivos pode induzir respostas de estresse, sejam elas hormonais, bioquímicas e enzimáticas dos peixes (Sampaio & Freire, 2016; Valladão et al., 2016; Vanderzwalmen et al., 2019). Neste contexto, o uso de anestésicos durante o transporte de peixes é adequado como mitigador das respostas de estresse e para favorecer o bem-estar dos animais (Zahl et al., 2012; Park et al., 2017; Teixeira et al., 2017).

Nos últimos anos os estudos com óleos essenciais de diferentes fontes vegetais, pertencentes principalmente às famílias Verbenaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Poaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Piperaceae e Zingiberaceae, revelaram a atividade anestésica destes para peixes nativos como do Brasil como *C. macropomum*, *Rhamdia quelen*, *Brycon amazonicus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*, entre outras (Ribeiro et al., 2016; Sena et al., 2016; Baldisserotto et al., 2018; Batista et al., 2018; Souza et al., 2019; Spanghero et al., 2019; Ventura et al., 2019; Aydin & Barbas, 2020). Com relação aos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Verbenaceae) e de *Mentha piperita* (Lamiaceae), eficácia anestésica e redução das respostas ao estresse durante o transporte dos peixes são comprovadas na literatura (Spanghero et al., 2019; Ventura et al., 2019), sendo prioritárias nos estudos para *C. macropomum*.

Considerando os efeitos fisiológicos do estresse em peixes, estudos indicam que o uso dos óleos essenciais promove a supressão da síntese de cortisol, bloqueando ou reduzindo o estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) ou pelo estímulo do sistema GABAérgico (Small, 2003; Heldwein et al., 2012; 2014). O eixo HHI é o principal mecanismo pelo qual os animais mobilizam energia mediante uma situação estressora. O principal produto do estímulo do eixo HHI nos peixes é o cortisol, que atua sobre brânquias, fígado e intestino resultando, principalmente, no aumento dos níveis de glicose plasmática e alterações no balanço osmorregulatório (Pankhurst et al., 2011).

Possíveis mudanças nas vias metabólicas por influência de fatores externos como exposição a xenobióticos, incluindo anestésicos precisam ser avaliadas (Velisek et al. 2001; Guptha et al. 2016; Lushchak, 2016). Estas poderão induzir um cenário de estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultado do desequilíbrio entre a concentração de agentes pró-oxidantes e antioxidantes no organismo (Lesser, 2006). Entre as defesas antioxidantes, as respostas enzimáticas como por exemplo as glutatona S-transferases (GST) são frequentemente avaliadas como biomarcadores de xenobióticos, mediadores do estresse oxidativo (Van der oost et al., 2003, Oruç et al., 2004). Além disso, alguns xenobióticos, como os anestésicos, podem ter efeitos inibitórios sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), importante para o controle do estímulo muscular (RAO et al., 2005). Assim, a análise da atividade da AChE é recomendada quando da administração de produtos anestésicos, especialmente no caso de anestésicos naturais cujas informações são mais escassas.

Este estudo avaliou o uso dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OELS) e *Mentha piperita* (OEMP) como redutor de estresse no transporte de *Colossoma macropomum*, enfatizando os efeitos sobre metabolismo energético e neurotoxicidade.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Obtenção das plantas, extração e caracterização química dos óleos essenciais

Folhas de plantas adultas das espécies *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* (Registro de acesso ao Patrimônio Genético - AB13781) foram coletadas no setor de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas. O material vegetal coletado foi identificado e depositado no herbário IAM da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. (Pediram para colocar o registro com quem podemos pegar esse número?)

Na extração do óleo essencial (OE) foi utilizado o processo de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger. Os óleos essenciais obtidos foram armazenados em frascos âmbar, a -4°C. A composição química de cada óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, conforme descrito por Potzernheim et al. (2012). Os componentes majoritários dos óleos de *L. sidoides* e *M. piperita* são apresentados na Tabela 1.

### 2.2. Procedimento experimental

Juvenis de tambaqui (peso: 127,55 ± 22,41 g) foram transportados em sacos plásticos contendo 15 litros de água e com adição de oxigênio puro durante quatro horas. Os peixes foram

divididos em seis tratamentos (n=15 peixes por grupo): 1) controle não estressado (NE - não submetido ao transporte), 2) controle estressado (E - submetido ao transporte), 3) OELS 10 mg L<sup>-1</sup>, 4) OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, 5) OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> e 6) OEMP 40 mg L<sup>-1</sup>, com três repetições. Os óleos essenciais foram diluídos em etanol (1:10). As concentrações selecionadas de OELS e OEMP utilizadas no estudo foram definidas como sedativas por Brandão (2020).

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (03/2017).

### 2.3. Análise dos parâmetros de qualidade de água

Os parâmetros de qualidade da água foram mensurados antes e após o transporte. Para obtenção dos valores de oxigênio dissolvido e temperatura utilizou-se um oxímetro digital (YSI Pro20) e para o pH foi utilizado um pHmetro digital (YSI F-1100). A alcalinidade, dureza, amônia e nitrito foram analisados conforme APHA (2018) e Tavares (1994).

### 2.4. Coleta sanguínea e análises

Amostras de sangue dos peixes foram coletadas, mediante punção de vasos caudais com o auxílio de seringas heparinizadas, nos momentos antes do transporte (n=15; na caixa de depuração) e imediatamente após o transporte (n= 10 por saco plástico; logo após a abertura dos sacos). As amostras de sangue foram centrifugadas e após separação do plasma foram armazenadas a -20 °C para posterior análise de parâmetros hormonais e bioquímicos.

Após a coleta sanguínea, os peixes foram anestesiados e sacrificados por punção craniana (CONCEA, 2018), e os tecidos (cérebro, músculo e fígado) foram coletados, conservados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80 °C até a realização das análises bioquímicas e enzimáticas.

### 2.5. Análise de cortisol

O cortisol plasmático foi determinado pelo método de imunoenensaio enzimático, utilizando um kit comercial (Human Elisa 55050), conforme protocolo do fabricante. A leitura de absorbância foi realizada utilizando-se um leitor de microplacas em 450 nm.

## 2.6. Análises bioquímicas

A glicose e o lactato plasmático foram determinadas por métodos colorimétricos, utilizando kits comerciais (Labtest®, MG, Brasil). A leitura de absorvância da glicose e do lactato plasmático foi realizada em espectrofotômetro (Spectronic Genesis-2), em 510 nm e em 340 nm, respectivamente.

Quanto à amônia plasmática, amostras de plasma (100 µl) foram desproteinizadas em 1ml de TCA a 20% e centrifugadas a 2000 RPM por 3 minutos. Alíquotas de sobrenadante foram submetidas aos ensaios colorimétricos pela adição do reativo Nessler (Imbralab), com incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. Seguiu-se, então, a leitura de absorvância em 420 nm, comparada com curva padrão de concentrações conhecidas de NH<sub>4</sub>Cl (Gentzkow & Masen, 1942)

Para determinação do glicogênio hepático e muscular utilizou-se a metodologia de Bidinotto et al. (1997). Brevemente, amostras de fígado (50 mg) e músculo (100 mg) foram digeridas em condições alcalinas extremas (1ml de KOH 6 N) a 100 °C por 2 a 3 minutos. Após isso, foi adicionado 2ml de etanol PA e 0,1ml de sulfato de potássio 10% para precipitação do glicogênio, por centrifugação a 3000 rpm por 3 minutos. Uma alíquota dessa ressuspensão foi utilizada para o ensaio do teor de açúcares totais (Dubois et al., 1956). A leitura do glicogênio foi feita em espectrofotômetro (Spectronic Genesis-2) em 650 nm.

## 2.7. Análises enzimáticas

As enzimas hexokinase (HK), piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas no músculo. Para isso, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas por 10 min (3.000 g, 4 °C) e o sobrenadante foi usado como fonte das enzimas. A concentração de proteína da amostra foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As leituras das absorvâncias de HK, PK e LDH foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific™) em 340 nm. As atividades enzimáticas estão expressas em µmoles substrato/mg proteína/minuto (=U/mg proteína).

### 2.7.1. Hexoquinase (HK)

Todos os reagentes foram mantidos a temperatura de 30 °C por 10 min. O meio de ensaio para análise de HK foi composto de: Adenosina 5`trifosfato 7 mM, NAD<sup>+</sup> 0,3 mM e G6PDH 2,5 U/µL. O ensaio foi baseado na redução do NAD<sup>+</sup> através de uma reação acoplada com **glicose-6-**

fosfato desidrogenase. A leitura da absorbância da reação foi realizada durante aproximadamente 10 minutos.

#### 2.7.2. Piruvato quinase (PK)

O meio de ensaio para análise de PK consistiu de KCl 150 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, NADH 0,15 mM, ADP 5,0 mM, 10 UI/ml de lactato desidrogenase, 1 mM de KCN, 50 mM de imidazol, pH 6,9 a 20 °C. As reações foram iniciadas com a adição de fosfoenolpiruvato 2,5 mM. A leitura da absorbância da reação foi realizada durante aproximadamente 10 minutos.

#### 2.7.3. Lactato desidrogenase (LDH)

O meio de ensaio para análise de LDH consistiu de: Imidazol (50 mM), pH 7,3, KCN (1 mM), NADH (0,15 mM) e o substrato Piruvato (10 mM) foi utilizado para iniciar as reações. A leitura da absorbância da reação foi realizada durante aproximadamente 10 minutos.

#### 2.7.4. Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada como descrito por Keen et al. (1976), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) como substrato. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific™) a 340nm, e a atividade enzimática foi calculada como nM do conjugado formado com o CDNB.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína usando um coeficiente de extinção molar de 9,6mM cm<sup>-1</sup>.

#### 2.7.5. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi medida no cérebro e músculo tal como descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Miron et al. (2005). As amostras de tecido foram homogeneizadas em TRIS-HCl (100 mM) pH 7,4. Os homogenizados foram centrifugados por 30 min (1000 rpm, 5 °C) e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima. Alíquotas de sobrenadante foram incubadas a 25 °C durante 2 min, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,5, 1 mM de DTNB como cromogênio. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de acetilcolina (10 mM) como substrato para a mistura reacional. A absorbância foi medida pela leitora de placa a 412 nm, durante 3-5 min.

## 2.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias e Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos dados. Para dados paramétricos foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste *pos hoc* de Tukey (HSD). Se não paramétricos, os dados foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido do teste *pos hoc* de Dunn. Em todos os casos,  $p < 0,05$  foi considerado como diferença significativa (ZAR, 1999).

## 3. Resultados

### 3.1. Parâmetros de qualidade de água

Não foi observada mortalidade dos peixes durante o transporte por quatro horas, assim como após sete dias do procedimento. Quanto a qualidade da água, os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura e pH não diferiram entre os tratamentos, após o transporte. Para a alcalinidade e dureza não foram observadas diferenças entre os tratamentos após o transporte, porém estes valores foram significativamente maiores do que os registrados antes do transporte. Com relação aos níveis de amônia e nitrito observou-se que, nos tratamentos com OE adicionado à água de transporte, houve redução significativa na concentração destes indicadores quando comparado ao valor do grupo controle submetido ao transporte (grupo E). Um aumento significativo de cerca de 18-24 vezes nos níveis de amônia e nitrito no grupo E em relação ao grupo NE foi observada (Tabela 2).

### 3.2. Parâmetros hormonais e bioquímicos

Após o transporte foi observado um aumento significativo do cortisol e glicose plasmática em todos os tratamentos comparado ao controle NE (Figura 1A). O menor nível de cortisol foi registrado no tratamento OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, mas não diferiu dos demais tratamentos com óleo essencial, sendo a diferença estatística significativa somente em relação ao controle E (Figura 1A). De forma semelhante, a glicose apresentou o menor valor no tratamento OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, com diferença significativa observada em relação ao tratamento OELS 10 mg L<sup>-1</sup> e OEMP 40 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1A). Quanto ao lactato plasmático, nos tratamentos com emprego de óleos essenciais foram registrados níveis significativamente mais baixos deste parâmetro quando comparado ao controle E, assim como ao controle NE (Figura 1A).

Para o glicogênio hepático foi observada, após o transporte, uma diminuição significativa nos níveis deste indicador no tratamento OELS 20 mg L<sup>-1</sup> quando comparado aos demais

tratamentos com óleo essencial, mas sem diferir do controle NE. A redução observada do glicogênio hepático em todos os tratamentos, após o transporte, foi significativamente diferente do controle NE, com exceção do tratamento OEMP 40 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1B). Com relação ao glicogênio muscular não houve diferença entre os tratamentos com emprego de OELS, OEMP e o controle E após o transporte, mas todos estes diferiram do controle NE (Figura 1B).

Os níveis de amônia plasmática aumentaram significativamente em todos os tratamentos, após o transporte, comparado ao controle NE. Dentre os tratamentos com óleos essenciais, o menor nível de amônia plasmática foi observado com emprego de OEMP 20 mg L<sup>-1</sup>, cujos valores foram significativamente diferentes dos registrados nos grupos OEMP 40 mg L<sup>-1</sup> e E (Figura 2).

### 3.3. Parâmetros enzimáticos

Para a HK não foi observada diferença estatística entre os tratamentos com óleo essencial e o controle E, após o transporte. Entre os tratamentos com óleo essencial, os maiores valores observados foram no grupo OELS 10 mg L<sup>-1</sup> que diferiu do OELS 20 mg L<sup>-1</sup> e do OEMP 40 mg L<sup>-1</sup>, assim como do controle NE (Figura 3A). Houve uma redução significativa na atividade da PK no tratamento com OELS 20 mg L<sup>-1</sup> em relação ao tratamento OEMP 40 mg L<sup>-1</sup>, controle E e NE (Figura 3A). Para a LDH observou-se aumento nos valores desta enzima, após o transporte, mas somente no grupo OELS 10 mg L<sup>-1</sup> e OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> essa diferença foi significativa em relação ao controle NE (Figura 3A).

Houve uma pequena elevação, embora significativa, na atividade da AChE no cérebro nos tratamentos OELS 10 mg L<sup>-1</sup> e OEMP 40 mg L<sup>-1</sup> em relação ao controle E, mas estes valores não diferiram dos tratamentos OELS e OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3B). Já para a atividade da AChE no músculo houve uma redução significativa nesses valores em todos os grupos após o transporte quando comparado ao grupo NE, com exceção do grupo OEMP 20 mg L<sup>-1</sup> e controle E (Figura 3B). O transporte em si influenciou na redução de 28,2% da atividade da AChE no músculo. Para a GST do cérebro, os maiores níveis foram observados nos tratamentos OELS e OEMP 20 mg L<sup>-1</sup>, que diferiram significativamente dos tratamentos OELS 10 mg L<sup>-1</sup> e OEMP 40 mg L<sup>-1</sup>, e este último tratamento que apresentou o menor valor foi significativamente diferente do controle E (Figura 3B). Em relação à GST no músculo, os menores valores foram registrados para OEMP 20 e 40 mg L<sup>-1</sup> em relação ao tratamento OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, e este último diferiu significativamente do controle NE (Figura 3B).

## 4. Discussão

### 4.1. Parâmetros de qualidade de água

A redução nos níveis de oxigênio dissolvido na água pode ser consequência da exposição dos animais ao estresse aumentando o seu consumo (King, 2009), sendo importante avaliar esse parâmetro em estudos experimentais. Neste estudo, a variação nos níveis de oxigênio dissolvido não foi significativa antes e após o transporte de *C. macropomum* com emprego dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *M. piperita*, de forma similar aos resultados obtidos com emprego dos óleos de *Aloysia triphylla*, *Lippia alba* e *Ocimum gratissimum* com os peixes *Rhamdia quelen*, *Paralichthys orbignyanus* e *Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*, confirmando a atuação destes óleos essenciais como sedativos e consequentemente diminuindo o metabolismo dos peixes em operações de transporte (Benovit et al., 2012; Daniel et al., 2014; Parodi et al., 2014).

Os valores de temperatura e pH mantiveram-se constante durante o transporte de *C. macropomum*, de forma similar ao relatado em outros trabalhos com emprego de óleo essencial (Daniel et al., 2014; Parodi et al., 2014; Sena et al., 2016). Por outro, o aumento nos valores de alcalinidade e dureza, observados no presente estudo, pode ser decorrente de resíduos excretados pelos animais (Parodi et al. 2014; Becker et al., 2017).

Com relação aos níveis de nitrito e amônia na água, nos grupos transportados com adição de óleos essenciais houve redução dos níveis desses indicadores, que pode ser reflexo da diminuição da atividade metabólica decorrente da sedação promovida pela adição dos óleos essenciais (Daniel et al., 2014; Parodi et al., 2014; Zeppenfeld et al., 2014; Becker et al., 2017).

### 4.2. Parâmetros hormonais e bioquímicos

Os maiores níveis de amônia plasmática neste estudo estão relacionados às maiores concentrações de amônia total na água, após o transporte de *C. macropomum*. Em resposta ao manuseio de *C. macropomum* anestesiados com *L. alba* (50 e 100 mg L<sup>-1</sup>) e em *Brycon amazonicus* anestesiados com eugenol (15 e 60 mg L<sup>-1</sup>), também houve aumento nos níveis de amônia plasmática (Barbosa et al., 2007; Batista et al., 2018). De forma geral, o aumento da amônia plasmática é conhecido como indicador de metabolismo alterado, por mediação do cortisol, e pode ser resultante de práticas de adensamento ou do uso de anestésicos em peixes que promovem o desequilíbrio nos batimentos cardíacos e operculares, e consequentemente dificultando a excreção dos compostos nitrogenados (Inoue et al., 2011).

Aumento nos níveis de cortisol após operações de transporte tem sido registrado para *C. macropomum*, conforme observado também nesse estudo (Chagas et al., 2012). Esse aumento pode ter ocorrido devido a re-liberação de grupos pré-sintetizados de hormônios adrenérgicos e esteroides ou seus precursores, indicando uma resposta de estresse em resposta a liberação de catecolaminas (Silva et al., 2015). Estudos avaliando a exposição dos peixes a diferentes anestésicos têm mostrado o mesmo comportamento, a elevação do cortisol plasmático (Zahl et al., 2010; Gressler et al., 2014). Essa elevação ocorre devido à baixa disponibilidade de oxigênio durante o procedimento anestésico, em razão da insuficiente ventilação branquial (Moliner & Gonzalez, 1995; Bolasina, 2006).

Neste estudo o aumento nos níveis de cortisol plasmático em todos os tratamentos com OELS e OEMP, após o manejo do transporte, está correlacionado com uma diminuição do glicogênio hepático. O glicogênio hepático é a principal fonte extra glicêmica para a manutenção das atividades do organismo (Nelson, 2014; Silveira et al., 2009). Em situações de estresse, como o transporte dos peixes, que demandam maior gasto energético resultam na quebra de glicogênio hepático, uma vez que este hormônio tem efeito sobre o fígado estimulando a glicogenólise, resultando no aumento da glicose plasmática (Mommsen et al., 1999; Bacurau, 2001; Silveira et al., 2009).

O aporte de glicose a partir das reservas no fígado explica o aumento observado no presente estudo nos níveis da glicose plasmática dos peixes após o procedimento de transporte. Resultado semelhante ao descrito por Sena et al. (2016) com emprego do óleo essencial de *L. alba* no transporte de *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*. Além disso, *C. macropomum* transportado com OELS 20 mg L<sup>-1</sup> apresentou uma redução significativa no cortisol e glicose, se comparado aos peixes transportados sem a adição de óleo essencial na água. Este fato, somado a uma redução nos teores de glicogênio do fígado neste tratamento, indicam que baixas concentrações deste óleo essencial ajudam a preservar as reservas hepáticas, sem comprometer a demanda de energia necessária em função do estresse decorrente da operação de transporte.

O glicogênio muscular também é uma reserva de energia do animal, porém para suprir sua própria manutenção. No presente estudo não houve diferença entre os tratamentos com adição de óleo essencial, após o transporte, e essa resposta também foi observada em *C. macropomum* anestesiados com eugenol (Barbosa et al., 2007).

O processo de anestesia pode influenciar na redução da circulação e da disponibilidade de oxigênio para as células, o que resulta na produção de lactato durante a via anaeróbica (Iversen et al., 2003). No trabalho de Sena et al. (2016) utilizando o óleo essencial da *L. alba* no transporte de *P. mesopotamicus* x *C. macropomum* foi observado níveis maiores de lactato plasmático nos

peixes. Entretanto, neste estudo observou-se os níveis de lactato plasmático de *C. macropomum* foram baixos após o transporte, indicando que OELS e OEMP não alteram os mecanismos geradores de energia no organismo.

#### 4.3. Parâmetros enzimáticos

A enzima HK converte a glicose em glicose-6-fosfato, uma etapa inicial na via glicolítica. Níveis significativamente maiores de atividade dessa enzima foi observado no tratamento OELS 10 mg L<sup>-1</sup> em comparação ao controle NE, no entanto a não diferença na atividade dessa enzima nos demais tratamentos com emprego de óleos essenciais em relação aos controles E e NE, indica que os óleos essenciais não comprometem essa etapa inicial da via glicolítica.

A via glicolítica foi especialmente estimulada nos peixes transportados com OEMP 20 mg L<sup>-1</sup>, pois a atividade das enzimas HK e PK estavam elevadas no tecido muscular. No entanto, a menor atividade da PK no tratamento OELS 20 mg L<sup>-1</sup>, relacionada com menores níveis de glicose plasmática, podem indicar a maior eficácia anestésica desse óleo em comparação com OEMP, diminuindo a demanda energética necessária para garantir a sobrevivência ou manutenção do organismo. Esse fato, associado a menor atividade da enzima LDH, aponta para o OELS como alternativa de anestésico para redução das respostas de estresse no transporte de *C. macropomum*.

Um outro aspecto importante a se avaliar é quanto aos efeitos deletérios que os óleos essenciais podem apresentar nos peixes, como a sua toxicidade. Neste sentido, a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase é uma técnica bem estabelecida e amplamente conhecida de biomarcação, que permite que sejam realizados estudos toxicológicos (Assis et al., 2010). Neste estudo, os óleos essenciais de *L. sidoides*, cujo composto majoritário do óleo é o timol (72,2%), e de *M. piperita*, que tem na composição mentol (33,8%), mentona (15,2%) e acetato de metila (13,0%), não apresentam neurotoxicidade, pois a atividade da AChE no cérebro não foi inibida em nenhuma das concentrações testadas, quando comparado ao controle NE. No tecido muscular houve uma redução nos níveis da AChE, após o transporte, em todos os tratamentos com óleo essencial, com exceção do OEMP 20 mg L<sup>-1</sup>, o que pode estar relacionada com a ação dos níveis elevados da amônia tanto no plasma quanto na água do transporte trazendo efeitos deletérios para o tecido muscular. Essa relação inversamente proporcional entre os níveis de amônia e a atividade da AChE foi relatada por Das et al. (2004). É importante destacar que neste estudo os óleos essenciais de *L. sidoides* e *M. piperita*, nas concentrações avaliadas, não promoveram a mortalidade de *C. macropomum* em até 10 dias pós-transporte. Efeito contrário

foi relatado por Silva et al. (2013) para *R. quelen* expostos a 300-600  $\mu\text{L L}^{-1}$  do óleo essencial de *L. sidoides*, pois os autores relatam alta mortalidade dos peixes e sugerem que este resultado pode ser decorrente da inibição da AChE.

O aumento da atividade da GST é capaz de promover a proteção, por detoxificação, contra os compostos reativos derivados do oxigênio (Sayeed et al., 2003). Isto foi observado por Modesto & Martinez (2010) expondo o *Prochilodus lineatus* a um xenobiótico e obtendo valores significativamente maiores de atividade da GST no fígado. Aumento significativo nos níveis de GST hepática e renal foi observado para *R. quelen* expostos aos quimiotipos citral e linalol do óleo essencial da *Lippia alba* (Souza et al., 2017). No presente estudo, redução da GST no músculo foram registrados para OEMP 20 e 40  $\text{mg L}^{-1}$ , indicando a queda da atividade da GST e provável aumento do estresse oxidativo, e efeito contrário com o tratamento OELS 20  $\text{mg L}^{-1}$  com maiores níveis de GST no cérebro e músculo de *C. macropomum* após o transporte.

Estudos adicionais com *C. macropomum* devem ser priorizados avaliando os compostos isolados dos óleos essenciais, assim como nanomoléculas visando aumentar a eficácia dos óleos essenciais e potencializando as suas atividades biológicas, a exemplo das atividades anestésicas e redutoras de estresse.

## 5. Conclusões

Os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita* influenciaram positivamente na qualidade da água do transporte com redução dos níveis de amônia total e nitrito, além de promover mitigação de respostas de estresse e não apresentaram efeitos neurotóxicos em *Colossoma macropomum*. Portanto, a concentração de 20  $\text{mg L}^{-1}$  de *Lippia sidoides* é a mais recomendada para o transporte da espécie.

## Agradecimentos

À Embrapa (MP2 - 02.12.01.020.00.00) pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo concedida a F.R. Brandão. Aos assistentes Edson Paiva Afonso e José Marconde da Costa e Silva, da Embrapa Amazônia Ocidental, pelo auxílio nas coletas dos peixes.

## Referências

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation. Washington DC.
- Assis, C.R.D., Castro, P.F., Amaral, I.P.G., Carvalho, E.V.M.M., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2010. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environmental toxicology and chemistry* 29 (10), 2243-2248.
- Aydin, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish. *Aquaculture*, 520, e734999.
- Bacurau, R. F., 2001. Nutrição e suplementação esportiva. Guarulhos: Phorte.
- Baldisserotto, B., Barata, L.E.S., Silva, A.S., Lobato, W.F.F., Silva, L.L., Toni, C., Silva, L.V.F., 2018. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. *Neotrop. Ichthyol.* 16, e170128.
- Barbosa, L.G., Moraes, G., Luis Antônio Kioshi Aoki Inoue, L.A.K.A., 2007. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 29 (3), 255-260,
- Batista, E.S., Brandão, F.R., Majolo, C., Inoue, L.A.K.A., Maciel, P.O., Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture* 495, 545–549.
- Becker, A.G., Luz, R.K., Mattioli, C.C., Nakayama, C.L., Silva, W.S., Leme, F.O.P., Mendes, H.C.P.M., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport?. *Aquaculture*, 481, 184-190.
- Bidinotto, P. M.; Moraes, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico do Cepta*, Pirassununga, v. 10, p. 53-60. 1997.
- Bolasina, S.N., 2006. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, 14, 569-575.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities

- of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Brandão, R.B., 2020. Anestesia e transporte de *Colossoma macropomum* com os óleos essenciais de *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*. Tese (Doutorado em Ciências pesqueiras nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 135p.
- Chagas, E. C., Araújo, L.D., Gomes, L.G., Malta, J.C.O., Varella, A.M.B., 2012. Efeito do cloreto de sódio sobre as respostas fisiológicas e controle de helmintos monogenóides em tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Amazônica*, 42, 439-444.
- CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, 2018. Diretriz Da Prática Eutanásia Em Animais Incluídos Em Atividades Ensino Ou Pesquisa Científica. [https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia\\_site-concea.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf) (accessed may 20 2019).
- Daniel, A.P., Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., Cunha, M.A., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Emanuelli, T., 2014. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. *Journal of Food Science*, 79 (6), 1205-1211.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28 (3), 350-356.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Gentzkow, C.J., Masen, J.M., 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 143, 531-544.
- Gressler, L.T., Riffel, A.P.K., Parodi, T.V., Saccol, E.M.H., Koakoski, G., Costa, S.T., Pavanato, M.A., Heinzmann, B.M., Caron, B., Schmidt, D., Llesuy, S.F., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto, B., 2014. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture research*, 45 (6), 1061-1072.
- Heldwein, C.G., Silva, L.L., Gai, E.Z., Roman, C., Parodi, T.V., Burger, M.E., Baldisserotto, B., Flores, E.M.M., Heinzmann, B. M., 2014. S-(C)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 41, 621-629.

- Heldwein, C.G., Silva, L.L.; Reckziegel, P., Barros, F.M.C., Bürger, M.E., Baldisserotto, B.; Mallmann, C.A., Schmidt, D.; Caron, B.O.; Heinzmann B.M., 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 45 (5), 436-443.
- Inoue, L.A.K.A., Boijink, C.L., Ribeiro, O.T., Silva, A.M.D., Affonso, E.G., 2011. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. Acta amazonica, 41 (2), 327 – 332.
- Iversen, M., Finstad, B., Mckinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture, 221 (1-4), 549-566.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Jakobi Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. J. Biol. Chemical, 251, 6183-6188.
- King, H.R., 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. Journal of Veterinary Behavior, 4 (4), 163-168.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annu. Rev. Physiol., 68, 253–278.
- Lushchak, V.I. 2016, Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. Fish physiology and biochemistry, 42 (2), 711-747.
- Miron, D.S., Crestani, M., Shettinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (heptapteridae). Ecotoxicology and Environmental Safety, 61 (3), 398-403.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere, 78 (3), 294-299.
- Molinero, A., Gonzalez, J., 1995. Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on githead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 111 (3), 405-414.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 9 (3), 211-268.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. In Biochemistry and molecular. Biology of fishes, 4, 393-434.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., Planas, J., 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two

- different seasons of the year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102 (2), 401-407.
- Nelson, D.L., 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 256 p.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137 (1), 43-51.
- Pankhurst, N. W., 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170 (2), 265–275.
- Park, I.-S., Gil, H.W., Lee, T.H., Nam, Y.K., Lim, S.G., Kim, D.S., 2017. Effects of clove oil and lidocaine-HCl anesthesia on water parameter during simulated transportation in the marine medaka, *Oryzias dancena*. *Dev. Reprod.* 21, 19-33.
- Parodi, T.V, Cunha, M.A., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Martins, D.I., Koakoski, G., Barcellos, L.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40 (2), 323–334.
- Potzernheim, M.C.L; Bizzo, H.R; Silva, J.P, Vieira R.F., 2012. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. *Biochem Syst Eco*; 42(1): 25-31.
- Rao, J.V., Begum, G., Pallela, R., Usman, P.K., Rao, R.N., 2005. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 478–483.
- Ribeiro, A.S., Batista, E.D.S., Dairiki, J.K., Chaves, F.C.M., Inoue, L.A.K.A. 2016. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 38, n. 1, p. 1-7.
- Saint-Paul, U., 2017. Native fish species boosting Brazilian’s aquaculture development. *Acta Fish. Aquat. Resour.* 5, 1–9.
- Sampaio, F.D.F., Freire, C.A. 2016. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish Fisheries*, 17, 1055–1072.
- Sayed, M.E., Rhodes, C.A., Ginski, M., Ghandehari, H., 2003. Transport mechanism (s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *International journal of pharmaceutics*, 265 (1-2), 151-157.
- Sena, A.C., Teixeira, R.R., Ferreira, E.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Caron, B.O., Schmidt, D., Couto, R.D., Copatti, C.E., 2016. Essential oil from *Lippia alba* has

- anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 465, 374–379.
- Silva, L.L., Garlet, Q.I., Koakoski, G., Abreu, M.S., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B., Barcellos, L.J.G., Heinzmann, B.M., 2015. Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. *Neotropical Ichthyology*, 13 (4), 715-722.
- Silva, L.L., Silva, D.T., Garlet, Q.I., Cunha, M.A., Mallmann, C.A., Baldisserotto, B., Longhi, S.J., Pereira, A.M.S., Heinzmann, B.M., 2013. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, 11 (2), 443–451.
- Silveira, M.R., Frolini, A.B., Verlengia, R., Cavaglieri, C.R., 2009. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. *Revista Brasileira Cineantropom Desempenho Hum*, 11 (4), 466-472.
- Small, B.C., 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 (1-4), 177-185.
- Souza, A. da S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., de Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: Implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169.
- Souza, C.F.; Baldissera, M.D.; Salbego, J.; Lopes, J.M.; Vaucher, R.A.; Mourão, R.H.V.; Caron, B.O.; Heinzmann, B.M.; Silva, L.V.F., Baldisserotto, B. 2017. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology* 15: e160083.
- Spanghero, D.B.N., Spanghero, E.C.A. de M., Pedron, J. Dos S., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Zaniboni-Filho, E., 2019. Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesq. Agropec. Bras.* 54, e00367.
- Tavares, L.H.S. 1994. Liminologia aplicada à aqüicultura. FINEP, 70 p.
- Teixeira, R.R., Souza, R.C., Sena, A.C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Couto, R.D., Copatti, C.E., 2017. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Reviews*, 48, 3383–3392.
- Valladão, G.M.R., Alves, L. O., Pilarski, F. 2016. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: Diagnosis, parasite, host-stage relationship and treatment. *Aquaculture*, 451, 444-450.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Aquaculture Reviews*, 10, 351–369.

- Van der Oost, R.J. B. and Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Reviem Toxicol, Pharmacol.* 13, 57-140.
- Vanderzwalmen, V., Eaton, L., Mullen, Henriquez, C.F., Carey, P., Snellgrove, D., Sloman, K.A., 2019. The use of feed and water additives for live fish transport. *Reviews in Aquaculture* 11, 263–278.
- Velisek, L., Moshe, S, Pellock, J.M, Dodson, W.E., Bourgeois, B.F., 2001. Pathophysiology of seizures and epilepsy in the immature brain: cells, synapses and circuits, *Paediatric epilepsy: diagnosis and therapy*, 2nd New York Demos Medical Publishing, 1-23.
- Ventura, A.S., de Castro Silva, T.S., Zanon, R.B., Inoue, L.A.K.A., Cardoso, C.A.L., 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *Int. Aquat. Res.* 11, 1–12.
- Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Olsen, R.E., 2010. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish physiology and Biochemistry*, 36 (3), 719-730.
- Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38 (1), 201–218.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. 4 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 17.
- Zeppenfeld, C.C., Toni, C., Becker, A.G., Miron, D.S., Parodi, T.V., Heinzmann, B.M., Barcellos, L.J.G., Koakoski, G., Rosa, J.G.S., Loro, V.L., Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*, 418, 101-107.

**Tabela 1.** Componentes majoritários dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*

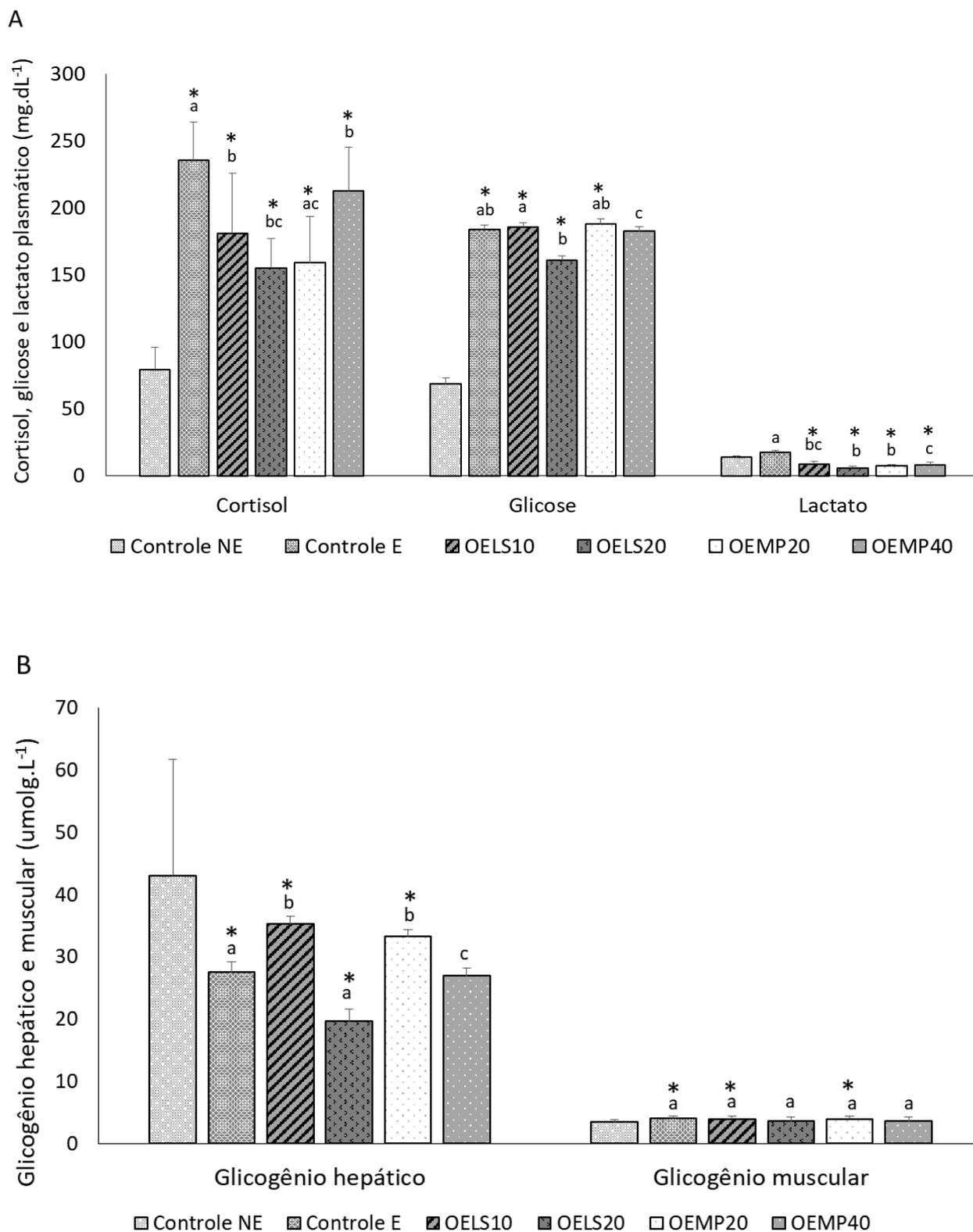
Planta	Componentes	Composição (%)	IR <sup>a</sup>
<i>Lippia sidoides</i>	mirceno	1,5	988
	<i>p</i> -cimeno	8,1	1022
	$\gamma$ -terpineno	2,2	1054
	timol	72,2	1289
	( <i>E</i> )-cariofileno	4,9	1417
	óxido de cariofileno	1,3	1582
<i>Mentha piperita</i>	$\alpha$ -pineno	1,0	932
	canfeno	1,3	946
	limoneno	4,7	1024
	mentona	15,2	1148
	mentol	33,8	1167
	pulegona	8,3	1233
	acetato de metila	13,0	1294

IR<sup>a</sup> (Índice de retenção)

**Tabela 2.** Parâmetros de qualidade água antes e após o transporte (4 h) de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com adição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*.

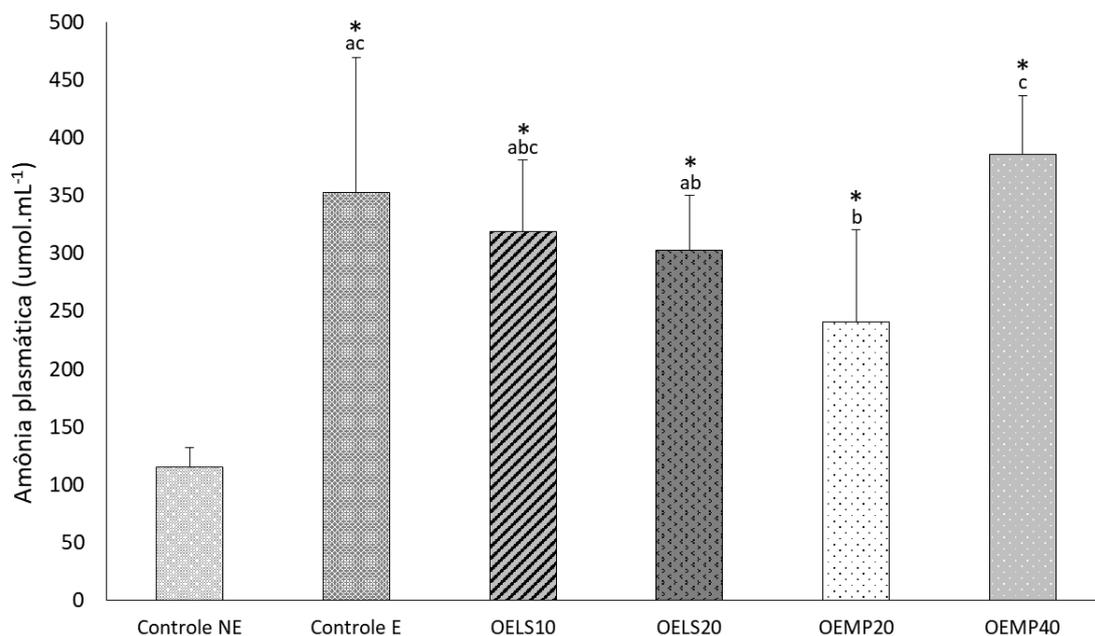
Parâmetros	Antes do transporte		Após o transporte			
	Controle (NE)	Controle (E)	<i>L. sidoides</i> 10 mg L <sup>-1</sup>	<i>L. sidoides</i> 20 mg L <sup>-1</sup>	<i>M. piperita</i> 20 mg L <sup>-1</sup>	<i>M. piperita</i> 40 mg L <sup>-1</sup>
Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	8,02 ± 0,09	8,91 ± 0,57 <sup>a</sup>	11,04 ± 2,19 <sup>a</sup>	13,2 ± 3,59 <sup>a</sup>	10,43 ± 2,52 <sup>a</sup>	9,61 ± 0,58 <sup>a</sup>
Temperatura (°C)	26,47 ± 0,12	25,43 ± 0,25 <sup>a</sup>	25,33 ± 0,23 <sup>a</sup>	25,50 ± 0,36 <sup>a</sup>	25,50 ± 0,30 <sup>a</sup>	25,50 ± 0,26 <sup>a</sup>
pH	5,88 ± 0,08	6,54 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,54 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,55 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,66 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,65 ± 0,06 <sup>a</sup>
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> )	11,00 ± 0,00	20,17 ± 4,58 <sup>a*</sup>	23,47 ± 2,54 <sup>a*</sup>	19,43 ± 2,29 <sup>a*</sup>	19,07 ± 2,29 <sup>a*</sup>	23,47 ± 0,64 <sup>a*</sup>
Dureza (mg L <sup>-1</sup> )	47,00 ± 0,00	60,77 ± 2,08 <sup>a*</sup>	60,43 ± 0,58 <sup>a*</sup>	60,10 ± 4,36 <sup>a*</sup>	60,77 ± 3,06 <sup>a*</sup>	59,77 ± 2,08 <sup>a*</sup>
Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	0,09 ± 0,05	1,62 ± 0,06 <sup>a*</sup>	1,26 ± 0,03 <sup>bd*</sup>	1,01 ± 0,08 <sup>e*</sup>	1,31 ± 0,05 <sup>b*</sup>	1,19 ± 0,05 <sup>bc*</sup>
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,01 ± 0,00	0,24 ± 0,06 <sup>a*</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>b*</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>b*</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>b*</sup>	0,03 ± 0,03 <sup>b*</sup>

Valores são expressos como média ± desvio padrão. Asteriscus indicam diferenças significativas quando comparados com valores antes do transporte ( $P < 0,05$ ). Letras diferentes, nas linhas, indicam diferenças entre os tratamentos após o transporte ( $P < 0,05$ ). NE – não submetido ao transporte, E – submetido ao transporte.

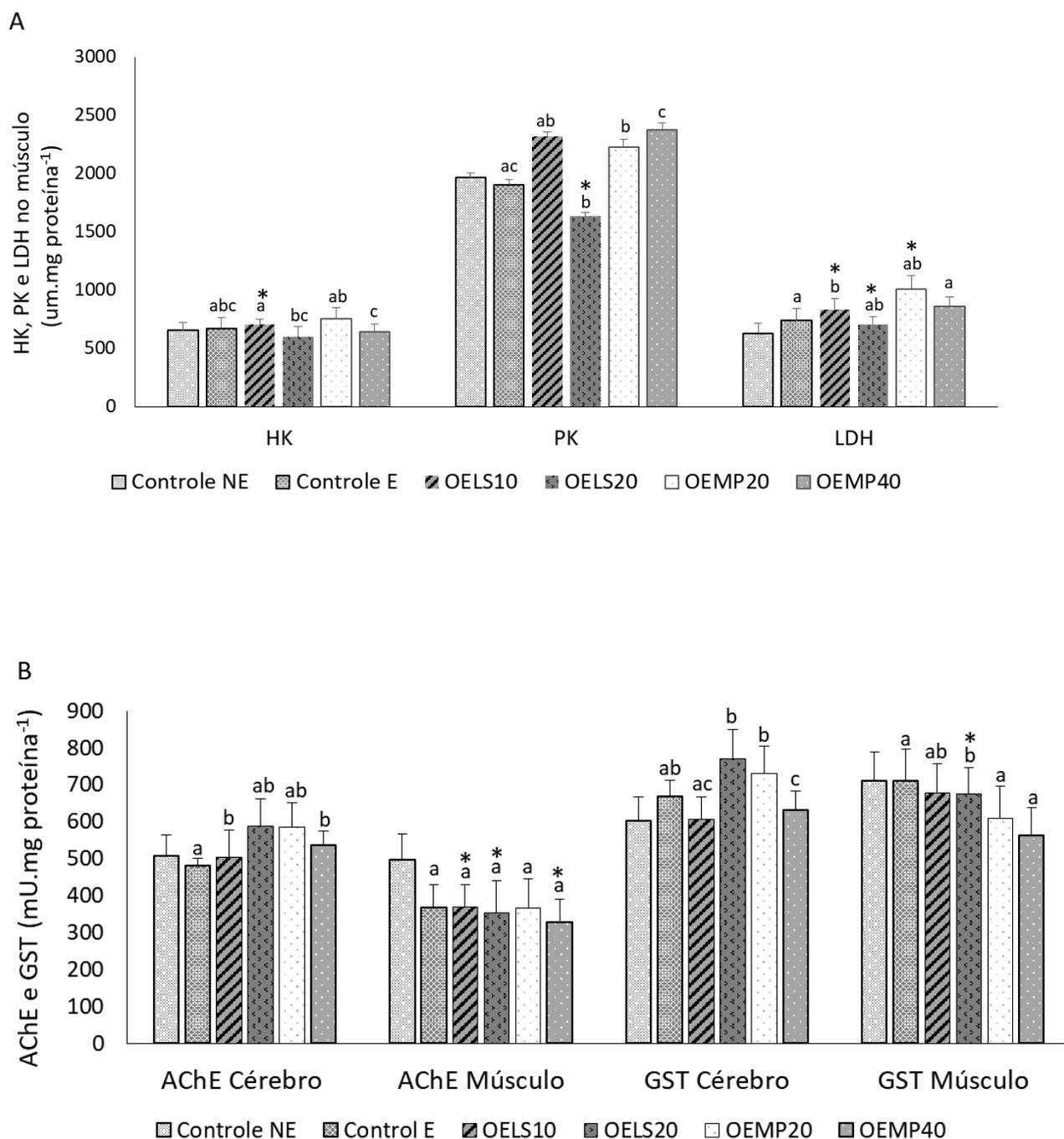


**Figura 1.** Parâmetros bioquímicos de *Colossoma macropomum* após transporte com os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*. A – cortisol, glicose e lactato plasmáticos, B –

glicogênio hepático e muscular. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o transporte. Asteriscos indica diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de *L. sidoides* 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de *L. sidoides* 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de *M. piperita* 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de *M. piperita* 40 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Amônia plasmática de *Colossoma macropomum* após transporte com os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o transporte. Asteriscos indica diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de *L. sidoides* 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de *L. sidoides* 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de *M. piperita* 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de *M. piperita* 40 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Parâmetros enzimáticos de *Collossoma macropomum* após transporte com os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*. A – LDH, HK e PK no músculo, B – AchE e GST no cérebro e músculo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, após o transporte. Asteriscos indica diferença estatística em relação ao controle NE. Nas análises foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn ou ANOVA seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Na legenda os significados são: NE – não estressado, E – estressado, OELS 10 – óleo essencial de *L. sidoides* 10 mg L<sup>-1</sup>, OELS 20 – óleo de *L. sidoides* 20

mg L<sup>-1</sup>, OEMP 20 – óleo de *M. piperita* 20 mg L<sup>-1</sup>, OEMP 40 – óleo de *M. piperita* 40 mg L<sup>-1</sup>.

LDH - Lactato Desidrogenase, HK - Hexoquinase e PK - Piruvato quinase.

## CONCLUSÃO GERAL

Os óleos essenciais apresentam uma nova descoberta para os estudos de moléculas com propriedades anestésicas. Estudos recentes descrevem os seus benefícios e sua contribuição para o bem-estar dos peixes, pois mitigam os efeitos indesejáveis do estresse causado pelas práticas rotineiras aplicadas nos sistemas de produção. Para *Colossoma macropomum*, os estudos com óleos essenciais têm utilizado principalmente a espécie *Lippia alba*, e, mais recentemente, novas espécies têm sido exploradas. Apesar disso, para aplicação como anestésicos e redutor do estresse no transporte desta espécie, somente quatro espécies de plantas foram estudadas. Portanto, é evidente a necessidade da prospecção de óleos essenciais de novas espécies de plantas para o uso nas práticas de manejo de *C. macropomum* e da avaliação da toxicidade destes óleos essenciais, visto os efeitos adversos que os compostos dessas plantas podem causar.

Quanto ao potencial anestésico dos óleos essenciais avaliados de *A. triphylla*, *L. sidoides* e *M. piperita*, durante os ensaios com base no comportamento de natação dos peixes foi observado um comportamento inversamente proporcional, isto é, quanto maior a quantidade de óleo essencial, menor o tempo de indução anestésica. Foi evidenciado que os três óleos estudados apresentaram propriedades anestésicas, porém, conforme a literatura, um anestésico eficiente deve apresentar o tempo de indução (< 5 min.) e recuperação (<10 min.) dentro do intervalo estabelecido. Levando isto em consideração, o óleo essencial de *L. sidoides* na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> se adequa a essas recomendações. Avaliando os danos histopatológicos em brânquias, o comprometimento morfofuncional das brânquias de tambaqui não foi observado pela aplicação das espécies estudadas.

Quanto à avaliação do transporte de tambaqui expostos aos óleos essenciais de *L. sidoides* e *M. piperita*, foi observado que esses tiveram uma ação redutora de estresse refletida pelas respostas hormonais, bioquímicas e enzimáticas avaliadas. A utilização dos óleos essenciais promoveu a supressão da síntese de cortisol pelo bloqueio ou redução da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal e foi capaz de atenuar a ativação dessa cascata hormonal associada ao estresse. Os tratamentos que receberam os óleos essenciais apresentaram melhor qualidade de água do transporte, sendo observado menores níveis de amônia e nitrito, o que contribui para o sucesso do transporte. Além disso, os óleos essenciais de *L. sidoides* e *M. piperita* não apresentaram ação neurotóxica para o tambaqui nas concentrações utilizadas. Portanto, a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de *Lippia sidoides* mostrou ser a mais eficiente como anestésico e redutor das respostas de estresse.

Por fim, ressalta-se a necessidade de monitoramento dos estudos e disponibilização de novos anestésicos, visando um produto que seja barato, de fácil diluição e seguro, reduzindo o risco alimentar. É importante que os novos anestésicos a serem utilizados na prática da aquicultura tragam resultados satisfatórios tanto para os produtores e quanto no tocante ao respeito das diretrizes ambientais, contribuindo para desenvolvimento do setor produtivo e levando maior biosseguridade e biossegurança no segmento da aquicultura.