

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

JONAS DA SILVA COSTA

**POTENCIAL ANÉSTESICO E SEDATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon
citratu* EM JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Marechal Cândido Rondon

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

JONAS DA SILVA COSTA

**POTENCIAL ANÉSTESICO E SEDATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon*
citratus EM JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Orientadora: Dra. Lilian Dena dos Santos
Co-Orientadora: Dra. Lenise Vargas Flores da Silva

Marechal Cândido Rondon

2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

da Silva Costa, Jonas
POTENCIAL ANÉSTESICO E SEDATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon citratus EM JUVENIS DE TAMBAQUI Collossoma
macropomum / Jonas da Silva Costa; orientadora Lilian Dena
dos Santos; coorientadora Lenise Vargas Flores da Silva. --
Marechal Cândido Rondon, 2023.
78 p.

Tese (Doutorado Campus de Marechal Cândido Rondon) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.

1. Aquicultura. 2. Fisiologia de Peixes. 3. Anestésico.
4. Produtos naturais. I. dos Santos, Lilian Dena, orient.
II. Vargas Flores da Silva, Lenise, coorient. III. Título.

JONAS DA SILVA COSTA

Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Doutor em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes / Aquicultura, APROVADO pela seguinte Banca Examinadora:

Coorientadora / Presidente – Prof.^a Dr.^a Lenise Vargas Flôres da Silva
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

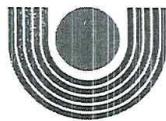
Membro – Prof.^a Dr.^a Lilian Carolina Rosa da Silva
Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina

Membro – Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester
Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina

Membro – Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Membro – Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Marechal Cândido Rondon, 02 de outubro de 2023.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.^a Dr.^a Lenise Vargas Flôres da Silva**, declaro como **COORIENTADORA** que **presidi** os trabalhos de defesa à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Jonas da Silva Costa**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Coorientadora e Presidente da Banca**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que o candidato foi considerado **APROVADO** na banca realizada em 02/10/2023, com o trabalho intitulado **“Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*”**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):



Documento assinado digitalmente

LENISE VARGAS FLORES DA SILVA

Data: 03/10/2023 16:23:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Lenise Vargas Flôres da Silva – COORIENTADORA/PRESIDENTE
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Modelo 2 – Para orientador(a) da Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, Prof.^a Dr.^a Lilian Carolina Rosa da Silva, declaro que participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato Jonas da Silva Costa, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, formalizo como Membro Interno, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado APROVADO na banca realizada em 02/10/2023, com o trabalho intitulado “Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*”.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):



Documento assinado digitalmente

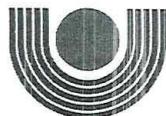
LILIAN CAROLINA ROSA DA SILVA

Data: 02/10/2023 11:25:06-0300

Verifique em <https://validar.itf.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Lilian Carolina Rosa da Silva
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina
Docente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unioeste

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Jonas da Silva Costa**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 02/10/2023, com o trabalho intitulado **“Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*”**.

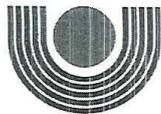
Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):



Documento assinado digitalmente
EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER
Data: 02/10/2023 17:44:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Jonas da Silva Costa**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 02/10/2023, com o trabalho intitulado "**Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum***".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA
Data: 03/10/2023 17:31:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Tese do candidato **Jonas da Silva Costa**, aluno de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que o candidato pode ser considerado **APROVADO** na banca realizada em 02/10/2023, com o trabalho intitulado **"Potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*"**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLOS EDUARDO COPATTI
Data: 02/10/2023 17:39:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Modelo 1 – Para membros de Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas, que me abençoou e me amparou mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora professora Dra. Lilian Dena dos Santos por me compreender nos momentos difíceis de incertezas durante a pandemia, aceitar a orientação, incentivo, e acompanhamento mesmo que a distância, minha enorme gratidão.

A minha coorientadora professora Dra. Lenise Vargas Flores da Silva pela dedicação, atenção, confiança e paciência comigo, minha enorme gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, que incluiu nossa pesquisa para receber apoio financeiro junto ao órgão de fomento, além de todas as contribuições com o presente estudo.

A coordenação do PPZ Unioeste, na pessoa da Profa. Dra. Maximiliane Alavarse Zambom, por toda atenção e ajuda (em momentos difíceis). Ao secretário do PPZ Paulo Henrique Morsch pelo atendimento excelente e total prontidão, muito obrigado.

Ao Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará – LaBBEx UFOPA, através da professora Dra. Rosa Helena Veras Mourão pela parceria nas extrações e análise química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, e da colaboração de sua equipe, especialmente o Lucas e Adenilson Barroso.

Ao Laboratório Múltiplo para Produção de Organismos Aquáticos da UFOPA, através dos Professores Dr. Luciano Jensen Vaz e Dra. Michelle Fugimura pela disponibilidade do laboratório para realização dos experimentos e sua equipe (Laura, Rosineia, João)

Ao Laboratório de Biologia da UFOPA, pelo empréstimo da Leitora de Microplaca Elisa DR-200b, aos técnicos Cleberson e Gilmara por toda atenção e disponibilidade.

Ao Laboratório de Análises Multifuncionais, pelo apoio nas análises, a Profa. Lenise e técnica Suelen Taise pela atenção e disponibilidade.

Ao amigo, Dr. Hugo Napoleão pela amizade, parceria e enorme contribuição na realização dos experimentos, auxílio nas análises bioquímicas, estresse oxidativo e análise estatística.

A minha querida esposa Paula Raniele, que me ajudou muito desde as análises em laboratório, incentivo e conselhos.

Ao amigo Marcelo Painelli, servidor da Unioeste Toledo, por todo apoio na estadia na cidade quando cursei disciplinas no campus Toledo- PR.

Aos Professores Dr. Luciano Garcia, Dr. Carlos Copatti, Dr. Eduardo Ballester e Dra. Lilian Silva por aceitarem compor a banca examinadora e pelas enormes contribuições para melhoria do presente trabalho.

Aos familiares, em especial minha mãe Gerlane Costa por todo incentivo a vida acadêmica, apoio financeiro, amor e carinho, muito obrigado. Que Deus abençoe cada um de vocês. Desde já obrigado imensamente a todos!

POTENCIAL ANÉSTESICO E SEDATIVO DO ÓLEO ESSENCIAL *Cymbopogon citratus* EM JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Resumo: O uso de substâncias como os óleos essenciais com potencial anestésico tem se intensificado na aquicultura. Algumas delas foram testadas como redutoras do estresse no transporte, sendo consideradas alternativas seguras, viáveis e que podem melhorar o bem-estar dos peixes. Neste estudo o objetivo foi avaliar o potencial anestésico e sedativo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). A Tese é constituída de dois capítulos onde, no primeiro avaliou-se diferentes concentrações do OECC, para indução e recuperação anestésica em tambaqui (experimento 1) e verificou-se seus efeitos sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em diferentes tempos de recuperação (experimento 2). No experimento 1, os peixes foram expostos a diferentes concentrações do óleo essencial (60, 80, 100, 120 mg/L), além do controle álcool para testes de indução anestésica e recuperação, no experimento 2, os juvenis de tambaqui (N= 48, 10.06 ± 0.31 cm e 9.9 ± 0.38 g), foram submetidos à biometria sob anestesia profunda na melhor concentração obtida no experimento 1 (100 mg/L OECC) e grupo controle (somente água). Após 0, 30, 60 e 120 minutos de recuperação, os peixes foram eutanasiados e coletados tecidos para análises bioquímicas e de estresse oxidativo. Os principais resultados indicam que a concentração crescente de óleo essencial diminuiu proporcionalmente o tempo para a indução anestésica. Não houve diferença significativa no tempo de recuperação entre as concentrações de óleo utilizadas. As concentrações de 100 mg/L e 120 mg/L de OECC mostraram melhores tempos para a indução anestésica em juvenis de tambaqui (161 segundos = 2,68 minutos e 170,5 segundos = 2,84 minutos), respectivamente. O controle álcool não produziu efeito anestésico e nem sedativo. O OECC não provocou mortalidade nos animais expostos ao óleo essencial nos testes de indução anestésica, e de maneira geral melhorou os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo, estimulou a atividade antioxidante de substâncias como Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione reduzida (GSH) nos tecidos, com menores níveis de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). No segundo capítulo avaliou-se o uso do OECC como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui por 17 h. Os juvenis foram colocados em sacos plásticos de 10 L (10 juvenis/L ou 20 juvenis/saco) e oxigênio puro, em três concentrações de OECC (8, 10 e 12 mg/L), sendo que o OECC foi diluído em etanol (1:10), além dos grupos controle água e controle álcool. Os principais resultados indicam que não houve mortalidade em 0 e 24 h após o transporte ($p > 0.05$) entre os

tratamentos. O emprego de OECC 8 mg/L no transporte reduziu a excreção de amônia, perda de íons de Cl^- e K^+ e apresentou menores níveis glicêmicos no músculo, e com 12 mg/L reduziu o lactato e triglicerídeos. Além disso, foi possível observar melhores condições antioxidantes com uso do OECC, constatados pela aumento da atividade de enzimas antioxidantes SOD, em resposta ao aumento dos níveis de lipoperoxidação. O uso do OECC na concentração de 8 e 100 mg/L é recomendado para juvenis de tambaqui em transporte de longa duração 17h e manejos rápidos, respectivamente.

Palavras-chave: produtos naturais, transporte, anestesia, sedação, estresse oxidativo

ANESTHETIC AND SEDATIVE POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OIL
Cymbopogon citratus IN JUVENILES OF TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Abstract: The use of substances such as essential oils with anesthetic potential has intensified in aquaculture. Some of them have been tested as reducing stress during transport, and are considered safe, viable alternatives that can improve fish welfare. In this study the objective was to evaluate the anesthetic and sedative potential of *Cymbopogon citratus* essential oil (EOCC) in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). The Thesis consists of two chapters where, in the first, different concentrations of OECC were evaluated for anesthetic induction and recovery in tambaqui (experiment 1) and its effects on biochemical parameters and oxidative stress were verified at different recovery times (experiment two). In experiment 1, the fish were exposed to different concentrations of essential oil (60, 80, 100, 120 mg/L), in addition to the alcohol control for anesthetic induction and recovery tests. In experiment 2, tambaqui juveniles (N= 48, 10.06 ± 0.31cm and 9.9 ± 0.38 g), were subjected to biometry under deep anesthesia at the best concentration obtained in experiment 1 (100 mg/L EOCC) and control group (water only). After 0, 30, 60 and 120 minutes of recovery, the fish were euthanized and tissues were collected for biochemical and oxidative stress analyses. The main results indicate that the increasing concentration of essential oil proportionally decreased the time for anesthetic induction. There was no significant difference in recovery time between the oil concentrations used. Concentrations of 100 mg/L and 120 mg/L of OECC showed better times for anesthetic induction in tambaqui juveniles (161 seconds = 2.68 minutes and 170.5 seconds = 2.84 minutes), respectively. The alcohol control did not produce an anesthetic or sedative effect. EOCC did not cause mortality in animals exposed to essential oil in anesthetic induction tests, and generally improved metabolic and oxidative stress parameters, stimulated the antioxidant activity of substances such as Superoxide dismutase (SOD) and Reduced Glutathione (GSH) in tissues, with lower levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In the second chapter, the use of OECC as a sedative was evaluated in simulated conditions of transport of tambaqui juveniles for 17 hours. The juveniles were placed in 10 L plastic bags (10 juveniles/L or 20 juveniles/bag) and pure oxygen, in three concentrations of OECC (8, 10 and 12 mg/L), and the EOCC was diluted in ethanol (1:10), in addition to the water control and alcohol control groups. The main results indicate that there was no mortality at 0 and 24 h after transport ($p > 0.05$) between treatments. The use of OECC 8 mg/L in transport reduced ammonia excretion, loss of Cl⁻ and K⁺ ions and presented lower glycemic levels in the muscle, and with 12 mg/L it reduced lactate and triglycerides. Furthermore, it was possible to observe better

antioxidant conditions with the use of EOCC, verified by the increase in the activity of SOD antioxidant enzymes, in response to the increase in lipoperoxidation levels. The use of EOCC at concentrations of 8 and 100 mg/L is recommended for juvenile tambaqui in long-term transport 17h and rapid handling, respectively.

Keywords: natural products, transport, anesthesia, sedation, oxidative stress

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
1.1 OBJETIVOS GERAIS.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 BEM ESTAR E ESTRESSE EM PEIXES.....	9
2.2 ANESTESIA E SEDAÇÃO EM PEIXES.....	10
2.3 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO TRANSPORTE.....	12
2.4 ÓLEO ESSENCIAL <i>Cymbopogon citratus</i>	14
2.5 TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>).....	15
2.6 REFERÊNCIAS.....	16
3 POTENCIAL ANÉSTESICO DO ÓLEO ESSENCIAL <i>Cymbopogon citratus</i> EM JUVENIS DE TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i>.....	24
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.2.1 Material vegetal e extração de óleo essencial.....	27
3.2.2 Peixes.....	27
3.2.3 Experimento 1.....	28
3.2.4 Experimento 2.....	28
3.2.5 Parâmetros bioquímicos.....	29
3.2.6 Análises estatísticas.....	29
3.3 RESULTADOS.....	30
3.4 DISCUSSÃO.....	38
3.5 CONCLUSÃO.....	42
3.6 AGRADECIMENTOS	42
3.7 REFERÊNCIAS.....	42
4 ÓLEO ESSENCIAL <i>Cymbopogon citratus</i> COMO REDUTOR DE ESTRESSE EM TRANSPORTE SIMULADO EM JUVENIS DE TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i>.....	49
4.1 INTRODUÇÃO.....	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1 Obtenção e extração de óleo essencial.....	52
4.2.2 Peixes	52
4.2.3 Procedimento experimental	52
4.2.4 Análises de Água e fluxo líquido de íons	53
4.2.5 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.....	53
4.2.6 Análise estatística.....	54
4.3 RESULTADOS.....	54
4.4 DISCUSSÃO.....	62

4.5	CONCLUSÃO.....	65
4.6	AGRADECIMENTOS.....	65
4.7	REFERÊNCIAS.....	67
4.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção aquícola alcançou 629 mil toneladas de pescado em 2020, sendo que a criação de espécies de água doce, ou aquicultura continental, foi responsável por 551,9 mil toneladas, ou 87,7%, do total. As principais espécies de peixes cultivadas em água doce são a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), criada principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que é produzido principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste (IBGE, 2022). Entre as espécies de peixes nativos mais cultivadas em cativeiro destaca-se o tambaqui, motivado pela fácil disponibilidade de juvenis no mercado, bom crescimento, alta produtividade, tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, e principalmente devido a disponibilidade de tecnologias para a sua criação (IZEL et al., 2013, 2018; SAINT-PAUL, 2017; VALLADÃO et al., 2018).

Durante a rotina na piscicultura, os peixes estão submetidos a diversas situações de manejo que causam o estresse, tais como: biometria, captura, reprodução induzida e transporte (KANANI et al., 2013; BACCHETTA et al., 2020). O estresse gerado por essas situações pode impactar diretamente o crescimento, saúde e ocasionar a morte dos animais (BARTON, 2002; VIDAL et al., 2007). Além disso, esses manejos também podem causar danos epiteliais, perda de muco e escamas que podem contribuir para proliferação de patógenos (ROSS e ROSS 2008). Nesse contexto, a contenção por meio da anestesia reduz a agitação e metabolismo do peixe e aumenta a eficiência técnica dos procedimentos de manejo, assegurando o bem-estar dos animais e evitando prejuízos econômicos, decorrentes da mortalidade de indivíduos (COOKE et al.; 2004; BECKER et al., 2012), além de proporcionar mais segurança aos manipuladores (ROSS e ROSS 2008). Esta prática tem ganhado visibilidade dentro de um contexto de ética e bem-estar de animais aquáticos (BARBAS; HAMOY, 2020), sendo utilizada numa escala cada vez maior na aquicultura (SILVA et al., 2019).

Sendo assim, intensificou-se os estudos com produtos naturais extraídos de plantas, como os óleos essenciais, extratos vegetais ou seus compostos isolados, devido sua potencial atividade anestésica, em diferentes espécies de peixes (BOIJINK et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018). O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) já foi estudado em pesquisa com peixes ornamentais, como: acará bandeira, *Pterophyllum scallare* (OLIVEIRA et al., 2022), electric blue hap (*Sciaenochromis fryeri*) e labido yellow (*Labidochromis caeruleus*) (KIZAK et al., 2018). Em outra espécie de planta, o óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, que possui em sua composição o citral geranial (50.1%) e o neral

(40.3%) apresentou propriedades anestésicas em juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (LIMMA-NETTO et al. (2017) e *Rhamdia quelen* (SANTOS et al., 2017), bem como o *Cymbopogon nardus*, que possui citronellol (13.7%), geraniol (29.7%) e geranial (5.7%) em juvenis de tambaqui (BARBAS et al. 2017).

Assim, tendo em vista as características anestésicas desejáveis e em função de poucas informações sobre o uso do OECC em peixes da Amazônia, como o tambaqui, o OE desta planta foi selecionado para este estudo, destacando-se o fato deste óleo possuir em sua composição o *citral* que, já possui propriedades anestésicas descritas na literatura.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial anestésico e sedativo do OECC em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar o potencial anestésico do OECC em juvenis de tambaqui, com base nos tempos de indução e recuperação anestésica.

Avaliar os efeitos pós anestesia durante intervalos de 30, 60 e 120 minutos após recuperação, através de parâmetros de estresse oxidativo e metabólitos em tambaqui anestesiados com OECC.

Determinar a concentração de sedação para transporte de longa duração de tambaqui com OECC.

Avaliar o OECC como redutor de estresse no transporte de tambaqui, com base nos parâmetros de qualidade de água, bioquímicos e de estresse oxidativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BEM ESTAR E ESTRESSE EM PEIXES

O bem-estar em peixes está relacionado intrinsecamente com a livre opção de escolha do animal de acesso a determinados ambientes, busca por alimentos e luminosidade (VOLPATO, 2007). O estresse pode ser definido como a resposta fisiológica de um organismo a uma ameaça, iniciada com a percepção de um estímulo estressor, sendo essencial para a manutenção da homeostase e manutenção da vida do organismo (SCHRECK & TORT, 2016).

As respostas ao estresse em peixes podem ser classificadas como um conjunto integrado de reações, as quais podem ser divididas em respostas primárias, secundárias e terciárias. A primária, também conhecida como neuroendócrina, está relacionada à ativação dos eixos hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) e hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), além da liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides (cortisol) na corrente sanguínea. (WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas secundárias são caracterizadas pelos efeitos causados pela ação desses hormônios (cortisol e catecolaminas), tais como, aumento dos batimentos cardíacos, aumento do consumo de oxigênio (frequência respiratória), alterações no balanço osmótico, mobilização energética rápida e diminuição de número de linfócitos. Já, a resposta terciária consiste nas alterações oriundas das respostas primárias e secundárias, como: quedas nas taxas de crescimento, capacidade reprodutiva e imunossupressão, os efeitos estão atrelados ao tempo de exposição ao agente estressor (BARTON, 2002; BALASCH & TORT, 2019).

Segundo PERRY e CAPALDO (2011) com a liberação de catecolaminas, ocorre o aumento da ventilação branquial e conseqüentemente a passagem mais rápida da água pelas brânquias. Isso aumenta as trocas iônicas com o ambiente e os peixes de água doce que são hiperosmóticos em relação ao meio, aumentam a perda de íons e ganho de água. (ZEPPENFELD et al., 2014; SALBEGO et al., 2015).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Em condições fisiológicas normais, a célula produz espécies reativas ao oxigênio (EROs), em concentrações baixas é fundamental para o bom funcionamento das células (AKBARIAN et al., 2016), porém em concentrações altas há um estado de desequilíbrio entre as EROs, (quebra de homeostase), gerando um declínio no sistema de defesa antioxidante, resultando em danos aos componentes celulares (proteínas, carboidratos e lipídios). Este efeito

é denominado como estresse oxidativo (POLI et al., 2012). Segundo ALY et al. (2010) o estresse oxidativo é resultado de três causas: aumento na formação de EROs, (através de acúmulo de substâncias reativas), danos ao sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas responsáveis) e a incapacidade de reparar o dano do estresse oxidativo.

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O mecanismo enzimático antioxidante envolve as enzimas de proteção primária: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST) e o mecanismo antioxidante não enzimática a glutaciona reduzida (GSH), presentes em abundância nos tecidos de organismos aquáticos. (WENDELAAR BONGA, 2011; AKBARIAN et al., 2016; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017).

A SOD, é uma importante enzima responsável pela eliminação das EROS produzidas nas células (CHEESEMAN e SLATER, 1994). Essa enzima transforma o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O), a CAT converte de H_2O_2 em H_2O e O_2 (LI et al., 2009; VELISEK et al., 2011). A glutaciona peroxidase (GPx) catalisa a redução dos peróxidos inorgânicos e orgânicos, que dão origem a formação de EROs. A enzima glutaciona S-transferase (GST) é uma enzima envolvida nas reações de conjugação entre GSH e moléculas oxidadas, além da remoção de compostos endógenos e exógenos (xenobióticos) que são tóxicos (FROVA, 2006). A GSH é o mais abundante antioxidante, sendo rapidamente oxidado em situações em que ocorre aumento na produção celular de EROs. (OHARA, 2006)

2.3 ANESTESIA E SEDAÇÃO DE PEIXES

Os peixes apresentam nociceptores semelhantes aos encontrados em mamíferos, evidenciando a sensibilidade desses animais a dor e susceptibilidade a manejos que causam estresse (agente estressor). Diante disso é fundamental a utilização de produtos que minimizem a cascata de respostas ao estresse (SNEDDON, 2012). A anestesia dos peixes pode ser realizada de três maneiras: inalação, asperção branquial e injeção. De forma geral, a anestesia por inalação é o método mais usual em propriedades aquícolas, realizada por meio de banhos de imersão, sendo o anestésico adicionado a água e absorvido pelas brânquias, onde entra na corrente sanguínea e atinge o sistema nervoso central (ZAHL et al., 2012).

Nos protocolos de indução anestésica, os peixes apresentam diferentes estágios, que são estabelecidos de acordo com respostas comportamentais. Na Tabela 1, alguns desses estágios podem ser observados como a redução de respostas aos estímulos externos, frequência respiratória, alterações na natação e perda de equilíbrio (SMALL, 2003).

Tabela 1. Estágios de indução à anestesia em peixes

Estágio	Descrição	Características
I	Sedação leve	Perda parcial a resposta a estímulos externos
II	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, natação errática e lenta
III	Anestesia profunda	Perda total do tônus muscular e reflexos; ventilação lenta
IV	Colapso medular	Sem movimentos respiratórios; peixe morre

Fonte: SMALL (2003).

Os tempos de indução e recuperação devem nortear a escolha de qual anestésico que será empregado. O anestésico ideal deve produzir anestesia rápida, não excedendo 3 minutos (rápida ação) e proporcionar recuperação rápida em no máximo 10 minutos, além de ser eficaz em baixas concentrações, ser de baixo custo e prático para uso, além de ser ausente de resíduos e seguro para humanos, animais e meio ambiente (TRUSHENSKI et al., 2013; PURBOSARI et al., 2019).

A concentração e o tempo necessário para indução e recuperação dos animais pode variar em função de fatores inerentes ao fármaco utilizado (OSTRENSKY et al., 2016), a espécie a ser anestesiada (FERNANDES et al., 2016), estágio de vida, tamanho e peso dos animais (RIBEIRO et al., 2019; TARKHANI et al., 2017). Contudo, a escolha do anestésico deve ser feita de forma criteriosa e partir do conhecimento de sua farmacodinâmica. (BALDISSEROTTO et al., 2017).

Os anestésicos empregados em peixes são divididos em produtos sintéticos ou naturais. As substâncias anestésicas mais utilizadas na aquicultura são a triclaína metano sulfonato (MS-222), a benzocaína, o metomidato e o 2-fenoxietanol, todos sintéticos (Z AHL et al., 2012). Dentre os citados acima o anestésico mais utilizado no mundo e único aprovado nos Estados Unidos é o MS-222, o qual não é produzido no Brasil, e tem alto custo para aquisição (READMAN et al., 2013; TRUSHENSKI et al., 2013). No entanto, o uso de produtos sintéticos apresentam resultados variáveis e podem causar efeitos adversos em peixes, tais como perda de muco, irritação e danos em tecidos brônquiais e olhos (INOUE et al., 2011; FERNÁNDEZ-PARRA et al., 2017), além de problemas inerentes ao descarte no meio ambiente e acúmulo de

resíduos em peixes ou humanos (PURBOSARI et al., 2019).

2.4 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A busca por substâncias alternativas, tem se intensificado na aquicultura, ampliando assim, as opções de produtos naturais derivados de plantas para uso como anestésicos em peixes (HOSEINI et al., 2018; SOUZA et al., 2019). Muitos estudos recentes recomendaram óleos essenciais de plantas medicinais como anestésicos, pois apresentaram uma alternativa para manejos rotineiros como a biometria em piscicultura. Outras substâncias foram testadas como redutores do estresse no transporte e, se mostraram como uma alternativa segura e viável, contribuindo para melhorar o bem-estar dos peixes (SACCOL et al. 2016; SACCOL et al. 2017; LIMMA- NETTO et al. 2018; AYDIN e BARBAS 2020; HE et al. 2020; HOSEINI et al. 2022; MIRZARGAR et al. 2022; YOUSEFI et al. 2022; BRANDÃO et al. 2022). Isto se dá em razão dos componentes dos óleos essenciais de algumas plantas apresentarem características sedativas e/ou anestésicas, que podem estar ligadas aos seus compostos majoritários e/ou da sinergismo entre seus compostos químicos (BATISTA et al., 2018; SOUZA et al., 2019; SPANGHERO et al., 2019). Os componentes bioativos dos óleos essenciais podem reduzir o metabolismo dos peixes, consumo de oxigênio e manter a qualidade da água durante transporte (BECKER et al., 2017; JEREZ-CEPA et al., 2019). Desta forma, favorecendo a condição de bem-estar dos peixes, durante e após as práticas de manejo. (BARBAS et al., 2017; BIANCHINI et al., 2017).

O transporte de juvenis de várias espécies de peixes na Amazônia como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), entre outros, são geralmente realizados em sacos plásticos ou em caixas de transporte contendo aeração ou injeção de oxigênio comprimido. Durante o transporte pode ocorrer a deterioração da água, devido a respiração e excreção de amônia pelos animais (GOMES, 2003).

Segundo Grottum et al. (1997), o principal fator determinante de sucesso do transporte é manter a maior densidade de carga em um menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, perda da qualidade da água, minimizando assim o estresse. O uso do anestésico ao longo do transporte pode diminuir o estresse e a agitação dos animais, evitando danos físicos e permitindo o uso de densidades mais elevadas (PURBOSARI et al., 2019).

Para o transporte de peixes, os anestésicos devem ser usados em estágio pré-anestesia (sedação leve), por contribuir para a redução da atividade metabólica, reduzindo os efeitos causados pelo transporte (ROSS e ROSS, 2008). Neste sentido, os compostos naturais, eugenol e mentol (SALBEGO et al., 2017; FAÇANHA e GOMES 2005), presentes em óleos essenciais

isolados de plantas (SAYDMOHAMMED e PAL, 2009), mostraram-se eficientes como anestésicos em diferentes espécies de interesse comercial (RIBEIRO et al., 2019). Estes diferentes estudos com a utilização de outros óleos essenciais, como o de *Lippia alba* para jundiá (*Rhamdia quelen*) (BECKER et al., 2012; SALBEGO et al., 2017), matrinã (*Brycon amazonicus*) (SACCOL et al., 2017) e óleo essencial de *Curcuma longa* (SACCOL et al., 2016) e *Cymbopogon nardus* (BARBAS et al., 2017) para tambaqui, também se mostraram eficientes como anestésicos.

2.5 ÓLEO ESSENCIAL de *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* é uma planta nativa de regiões tropicais do continente asiático, especialmente da Índia, pertencente a família Poaceae, é uma herbácea, conhecida popularmente como capim-cheiroso, capim cidreira, capim-limão, capim de cheiro ou cana de cheiro. A espécie apresenta bom desenvolvimento em regiões de clima quente, alta umidade, temperatura e pluviosidade ao longo do ano, apresentando longas folhas aromáticas, estreitas, e hábito de crescimento estolonífero (ORTIZ et al., 2002; SANTOS et al., 2009; OLADEJI et al., 2019) (Figura 2). É uma planta muito utilizada na medicina popular, sendo o óleo essencial extraído das folhas amplamente utilizado na indústria farmacêutica, cosméticos e alimentação (PINTO et al., 2013), bem como para obtenção de seus compostos químicos que apresentam propriedades antiinflamatórias, antissépticas, antibactericidas, antifúngicas, diuréticos, tranquilizantes (DEVI et al., 2011; AL SAGHEER et al., 2018; SOUZA et al., 2019) e de combate a parasitas em tambaqui (60 µg/L) (PEREIRA et al., 2020; GONZALES et al., 2020)

Alguns estudos prévios mostraram que o OECC pode ser usado como anestésico em peixes (KIZAK et al., 2018) uma vez que, os óleos essenciais de *L. alba* e *A. triphylla*, que também têm o citral como composto majoritário, foram eficazes como anestésicos em jundiás *Rhamdia quelen* (BECKER et al., 2018; SOUZA et al., 2018) e juvenis de tambaqui (SILVA et al., 2019).



Fig. 1 . Exemplar da planta capim limão (*Cymbopogon citratus*)Fonte: <https://www.pha-tad-ke.com/plant/cymbopogon-citratus/>

Além do *citral* outros componentes monoterpênicos como geraniol e citronelol estão presentes no óleo essencial de *C. nardus*, *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon winterianus* (BASTOS et al., 2010; CASTRO et al., 2010). Os óleos essenciais dessas plantas têm se destacado por suas propriedades farmacológicas apresentando ação anticonvulsivante, antinociceptiva, antibacteriana e efeitos anestésicos (BASTOS et al., 2010; DE MENEZES-FILHO et al., 2014; LOPEZ- ROMERO et al., 2015), além da rápida recuperação da função cardíaca pós anestesia (ARAÚJO et al., 2023).

2.6 TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie reofílica nativa da Amazônia e bacias dos rios Orinoco (ARAÚJO-LIMA e GOULDING 1998; REIS 2003) seu consumo é apreciado no Brasil e diversos países da América latina (WOYNÁROVICH e ANROOY 2019). Ocupa o 2º lugar na produção de peixes do Brasil, ficando atrás apenas da tilápia do Nilo (PEIXE BR 2023). O tambaqui é caracterizado pela rusticidade (ARAÚJO-DAIRIKI et al. 2018), resistência a doenças (ARAÚJO-LIMA e GOULDING 1998), e tolera alterações na qualidade de água como mudança de temperatura, pH, amônia e oxigênio (VALENTI et al., 2021) o que o tornou uma espécie propícia para piscicultura (GOMES, 2003), sobretudo na

região Norte e Centro Oeste (Figura 3).



Fig 2. Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fonte: LAQUA

Essa espécie tem sido utilizada como modelo experimental para novos candidatos a anestésicos naturais por (FAÇANHA e GOMES, 2005; ROUBACH et al., 2005; INOUE et al., 2011; PÁDUA et al., 2013; BARBAS et al., 2017; SACCOL et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018). Com o emprego do óleo essencial de *L. alba* (quimiotipo citral), juvenis de tambaqui foram anestesiados com 100 $\mu\text{L/L}$ com peso de $1,4 \pm 0,5$ g e em 200 a 300 mg/L para tambaquis pesando $70,4 \pm 1,9$ g (BATISTA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Outras plantas que foram estudadas quanto à indução anestésica de tambaqui são as espécies *A. rosaeodora*, *A. parviflora*, *C. longa*, *C. nardus*, *M. sylvatica*, *N. cataria*, *O. gratissimum* e *P. divaricatum* (BALDISSEROTTO et al., 2018; SACCOL et al., 2017; BARBAS et al., 2017; SACCOL et al., 2019; BOIJINK et al., 2016; VILHENA et al., 2019)

Com isso, tendo em vista que anestésicos naturais alternativos são necessários para promover maior segurança e minimizar o estresse durante os diversos manejos de peixes (rápidos) e transporte (longos), buscou-se investigar os potenciais do OECC como anestésico e sedativo, uma vez que o presente estudo é o primeiro a investigar as alterações fisiológicas e bioquímicas referente aos efeitos do OECC na espécie tambaqui.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARIAN, A.; MICHIELS, J.; DEGROOTE, J. et al. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, n.37, p.1-14, 2016.
- AL-SAGHEER, A.A.; MAHMOUD, H.K.; REDA, F.M. et al. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture Nutrition** 24:1006–1014. 2018 <https://doi.org/10.1111/anu.12637>
- ALY, N.; KAWTHER, E. G.; MAHMOUD, F. et al . Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 1, p. 7-12, 2010
- ARAÚJO, E. R. L.; TORRES, M. F.; HAMOY, M. et al. Cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* anaesthetised with geraniol and citronellol. **Aquaculture**, 565, 739101. 2023
- ARAÚJO-DAIRIKI, T. B.; CHAVES, F. C. M., & DAIRIKI, J. K. Seeds of sachainchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae) as a feed ingredient for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). **Acta Amazonica**, v.48, p.32-37, 2018
- AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v.520, p.734999, 2020.
- BACCHETTA, C.; ROSSI, A.S.; ALE, A. et al . Physiological effects of stocking density on the fish *Piaractus mesopotamicus* fed with red seaweed (*Pyropia columbina*) and β -carotene-supplemented diets. **Aquaculture Research** 51, 1992–2003. 2020 <https://doi.org/10.1111/are.14551>
- BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the Stress Responses in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 62, 2019.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C.; HEINZMANN, B.M.; CUNHA, M.A. Farmacologia aplicada à aquicultura. Santa Maria, RS: Ed.UFSM. 656p. 2017
- BALDISSEROTTO, B.; BARATA, L. E.; SILVA, A. S. et al. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae) 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>
- BARBAS, L. A. L.; HAMOYB, M.; MELLO, V. J. et al. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. **Aquaculture**, v. 479, p. 60–68, 2017
- BARTON, B.A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to

Changes in Circulating Corticosteroids1. *Integrative and Comparative Biology*, 42, (517-525) 2002. 10.1093/icb/42.3.517

BASTOS, J.F.; MOREIRA, I.J.; RIBEIRO, T.P. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 106, 331–337. 2010 <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x>.

BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry** 38(3): 789-796. 2012

BECKER, A.J.; FOGLIARINI, C.O.; SOUZA, C.F. et al. Ventilatory Frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: A comparative approach between different essential oils. **Revista Brasileira de Zootecnia** 47:e20170185. 2018 <https://doi.org/10.1590/rbz4720170185>

BECKER, A.G.; LUZ, R.K.; MATTIOLI, C.C. et al. 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. 2017 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007>

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

BRANDÃO, F. R., DUNCAN, W. P., FARIAS, C. F. S. et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* as stress reducers during the transport of *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, 560, 738515. 2022

DE CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; DOS SANTOS, G. R. et al. Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 41, n. 2, p. 308, 2010.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radicals biochemistry. Oxford academic 49, 481–493. 1994 doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

CONDE-GARCIA, E.A.; SOUSA, D.P.; SANTOS, M.S. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture** 239, 509–529. 2004 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.028>

DE MENEZES-FILHO, J.E.R., GONDIM, A.N.S., CRUZ, J.S. et al. Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated *Rabbitileum*. **Journal of Smooth Muscle Research** 47:143–156. 2011 <https://doi.org/10.1540/jsmr.47.143>

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E A

ALIMENTAÇÃO. 2022 Faostat. Data. Food Balances. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em 15/02/2023

FERNANDES, I.M.; BASTOS, Y.F.; BARRETO, D.S. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic and in euthanasia procedure for small-sized tropical fishes. **Brazilian Journal of Biology** 77, 444–450. 2016 <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15015>

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* 23, 149–169. 2006 <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>

GOMES, L.C. Protocolo para o Transporte de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Vivo, EMBRAPA, Manaus-AM. 2003

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.

GONZALES, A. P. P. F.; YOSHIOKA, E. T. O.; MATHEWS, P. D. et al. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 528, p. 735500, 2020.

GROTTUM, J. A.; STAURNES, M.; SIGHOLT, T. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), kept at high densities during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 159-164.1997

HINOSTROZA, E.; & SERRANO-MARTÍNEZ, E. Efecto anestésico del metassulfonato de triclaína en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, 24(4), 451-458. 2013

HOSEINI, S. M.; TAHERI MIRGHAED, A.; PAGHEH, E. et al. Anesthesia of rainbow trout with citronellal: Efficacy and biochemical effects. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 337, n. 3, p. 227-237, 2022.

HOSEINI, S. M.; TAHERI MIRGHAED, A.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 550-564, 2019. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>>. Acesso em: 20/03/2023

INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, O.T. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta amazonica**, 41 (2), 327 – 332. 2011 <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200020>

IZEL, A. C. U.; CRESCENCIO, R.; O’SULLIVAN, F. L. A. et al. Produção intensiva de tambaqui 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. et al. Cultivo do tabaqui no Amazonas, 2a edição revista e atualizada. 2a. ed. Brasília: Embrapa, p. 59, 2018.

JEREZ-CEPA, I.; FERNÁNDEZ-CASTRO, M.; DEL SANTO O’NEILL, T.J. et al. Transport and Recovery of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Sedated with Clove Oil and MS-222: Effects on stress axis regulation and intermediary metabolism. **Frontiers in Physiology** 10, 1–13. 2019 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00612>

KANANI, H.G.; SOLTANI, M.; MIRZARGAR, S.S. Effect of tricainemethanesulfonate (MS222), clove oil and electro-anaesthesia on respiratory burst activity in whole blood and serum alternative complement response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), during the narcosis stage. **Fish and Shellfish Immunology** 34, 692–696. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.021>

KIZAK, V.; CAN, E.; CAN, S. S. et al. Anesthetic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil as a herbal agent in two ornamental fish species. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 70. 2018

LI, Z.H., XIE, S.; WANG, J.X.; SALES, J. et al. Effect of intermittent starvation on growth and some antioxidant indexes of *Macrobrachium nipponense* (De Haan). **Aquaculture Research** 40, 526–532.2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02123.x>

LOPEZ-ROMERO, J.C.; GONZÁLEZ-RÍOS, H.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015, 9p.

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

MIRZARGAR, S. S.; TAHERI MIRGHAED, A.; HOSEINI, S. M. et al. Biochemical responses of common carp, *Cyprinus carpio*, to transportation in plastic bags using thymol as a sedative agent. **Aquaculture Research**, 53(1), 191-198. 2022

MENEZES - FILHO, J. E. R.; GONDIM, A. N. S.; CRUZ, J. S. et al. Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful effects to treat arrhythmias. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 115(6), 534-544. 2014

NETTO, J. D. L.; OLIVEIRA, R. S.; & COPATTI, C. E. Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in sedation and anesthesia of juveniles of Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89, 2971-2974. 2017

OHARA, A. (2006). *Radicais livres: bons, maus e naturais*. Oficina de Textos.

OLADEJI, O.S.; ADELOWO, F.E.; AYODELE, D.T. et al . Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scient Afric** 6:00137. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>

OLIVEIRA, I. C.; OLIVEIRA, R. S. M.; LEMOS, C. H. D. P. et al. Essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Lippia sidoides* in the anesthetic induction and transport of

ornamental fish *Pterophyllum scalare*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 48(3), 501-519. 2022

ORTIZ, R.S.; MARRERO.; G. V E NAVARRO, A. L. T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Caña Santa). **Revista cubana de plantas medicinales**. 7, 89-95. 2002

OSTRENSKY, A.; PEDRAZZANI, A.S.; VICENTE, A.L. Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2,6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). **Aquaculture Research** 47, 3477–3488. 2016 <https://doi.org/10.1111/are.12797>

PÁDUA, S.B et al. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1171-1174, 2013.

PEIXE BR. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário brasileiro da piscicultura Peixe Br 2023**. São Paulo, 2022. Disponível em: <PeixeBR | Anuário 2023>. Acesso em: 14/04/2023

PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, E. C.; SOUSA, E. M. O. et al. Lethal concentration of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil for *Dolops discoidalis* and *Argulus* sp.(Crustacea: Argulidae). **Journal of fish diseases**, 43(12), 1497-1504. 2020

PERRY, S. F; CAPALDO, A. The autonomic nervous system and chromaffin tissue: neuroendocrine regulation of catecholamine secretion in non-mammalian vertebrates. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 165(1), 54-66. 2011

PINTO, D. A.; MANTOVANI, E. C.; MELO, E. C. et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s 2016, 54-61. 2013

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry** 11, 1163–1182. 2012

PURBOSARI, N. et al. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. **Aquaculture and Fisheries**, v.4, p.129-133, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468550X18301059>>. Acesso em: 15/05/2023

READMAN, G. D; OWEN, S. F; MURRELL, J. C. et al. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre (Brazil), Edipucrs, 2003. 183p. **Rev. Ciênc. Agron.** 41, 308–314. 2013

RIBEIRO, P.A.P.; DE MELO HOYOS, D.C.; OLIVEIRA, C.G. et al. Eugenol and benzocaine as anesthetics for *Lophiosilurus alexandri* juvenile, a freshwater carnivorous catfish. **Aquaculture International** 27, 313–321. 2019 <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0326-3>

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

- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; LEÃO FONSECA, F. A. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- RUCINQUE, D. S.; POLO, G.; BORBÓN, J. et al. Uso anestésico de eugenol e benzocaína em tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 30(1), 60-66. 2017 <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v30n1a07>.
- SACCOL, E.M.H.; JEREZ-CEPA, I.; OURIQUE, G. M. et al. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, 117,(150-160). 2018 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.009>
- SACCOL, E.M.H. TONI, C.; PÊS, T. S. et al . Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. And *Curcuma longa* L. Essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research**. 48, 2012–2031. 2016
- 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. 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.
- SANTOS, A. C.; JUNIOR, G. B.; ZAGO, D. C. et al. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, 44(1), 106-113. 2017
- SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 436-441, 2009.
- SAYDMOHAMMED, M., & PAL, A. K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, 298(1-2), 162-167. 2009
- 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.
- SILVA, H.N.P.; CARVALHO, B.C. F. D.; MAIA, J.L.D.S. et al. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural** 49, 84 e20181059. 2019
- 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** 218, 177–185. 2003 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00302-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00302-2)
- SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, 21(1), 32-43. 2012.

SOUZA, C.; BALDISSERA, M.; BALDISSEROTTO, B. et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A Review. **Front Physiol** 10:785. 2019 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>

SOUZA, A.D.S.L.; PERET, A.C.; HAMOY, M. et al. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. **Aquaculture** 500, 160–169. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018>.

SOUZA, C.; BALDISSERA, M. D.; BIANCHINI, A. E. 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 (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 44, 21-34. 2018

STRINGHETTA, G. R.; BARBAS, L. A.; MALTEZ, L. C. et al. Oxidative stress responses of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* after short-term anesthesia with benzocaine and MS-222. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89, 2209-2218. 2017

TARKHANI, R.; IMANI, A.; JAMALI, H. et al. Anaesthetic efficacy of eugenol on various size classes of angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). **Aquaculture Research** 48, 5263–5270. 2017 <https://doi.org/10.1111/are.13339>

TRUSHENSKI, J. T; BOWKER, J. D; COOKE, S. J. et al. Issues Regarding the Use of Sedatives in Fisheries and the Need for Immediate-Release Options. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142(1), 156-170. 2013

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

VALENTI, W.C.; BARROS, H.P.; MORAES-VALENTI, P. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.10,n.2,p.351-369, 2018. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z.H. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture** 310, 369–375. 2011 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>

VIDAL, L. V. O; ALBINATI, R. C. B; DOS SANTOS NETO, E. B. et al. Influência do peso de juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* e tambaqui *Colossoma macropomum* à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 8(3). 2007

VOLPATO, G.L. Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.53-61, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982007001000006&nrm=iso>. Acesso em: 23/04/2023

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress: Hormone response to stress In: FARRELL, A.P; CECH, J.J; RICHARDS, J.G; STEVENS, E.D. (Eds). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. Ed: Elsevier, Vancouver, 2011. 2266p.

WOYNÁROVICH, A.; VAN ANROOY, R. A. Field guide to the culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816). **FAO – Fisheries and Aquaculture Technical Paper**, 2019. 624p.

YOUSEFI, M.; HOSEINI, S. M.; AYDIN, B. et al. Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 547, (737540). 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737540>

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

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

Artigo intitulado **POTENCIAL ANÉSTESICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* EM JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum***, que foi submetido na revista **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Qualis capes para Zootecnia/ Recursos Pesqueiros)

3. POTENCIAL ANÉSTESICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* EM JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Resumo: O estudo teve como objetivo avaliar diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) para indução e recuperação anestésica em tambaqui *Colossoma macropomum* e verificar seus efeitos sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo. Foram conduzidos dois experimentos. No experimento 1, os peixes ($10,06 \pm 0,31$ cm e $9,9 \pm 0,38$ g) foram expostos a diferentes concentrações do OECC (60, 80, 100, 120 mg/L), além do controle álcool (água + 1173 μ L/L etanol). O OECC foi diluído em etanol (1:10). Para a avaliação, os animais foram induzidos individualmente. Nos testes foram utilizados 10 peixes para cada concentração de OECC avaliada e os peixes foram utilizados apenas uma vez. A indução anestésica foi realizada em recipientes contendo 1L de água + as diferentes concentrações do OECC e a recuperação em recipientes com 2L de água. Todos os animais submetidos ao teste de indução anestésica com o OECC atingiram o estágio de anestesia e se recuperaram. No experimento 2, os juvenis de tambaqui (N= 48, $10,06 \pm 0,31$ cm e $9,9 \pm 0,38$ g), foram submetidos à biometria sob anestesia profunda na melhor concentração obtida no experimento 1 (100 mg/L OECC - N=24) e grupo controle água (N=24). Após 0, 30, 60 e 120 minutos de recuperação, foi realizada a eutanásia de todos os peixes por secção da medula espinhal. Amostras de tecidos (fígado, músculo e brânquias) foram coletadas, congeladas e armazenadas a -20 °C para as análises bioquímicas e de estresse oxidativo. No experimento 1, os dados mostraram que a concentração crescente de óleo essencial diminuiu proporcionalmente o tempo para a indução anestésica. Não houve diferença significativa no tempo de recuperação entre as concentrações de óleo utilizadas. As concentrações de 100 mg/L e 120 mg/L de OECC mostraram melhores tempos para a indução anestésica em juvenis de tambaqui (161 segundos = 2,68 minutos e 170,5s = 2,84 minutos), respectivamente. O controle álcool não produziu efeito anestésico e nem sedativo. O OECC não provocou mortalidade nos animais expostos ao óleo essencial nos testes de indução anestésica. No experimento 2, os resultados indicam que o uso do OECC de maneira geral melhorou os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo, estimulou a atividade antioxidante de substâncias como SOD e GSH nos tecidos, com menores danos ao metabolismo lipídico (TBARS). Portanto o uso do OECC na concentração 100 mg/L pode ser recomendado para anestésiar juvenis de tambaqui em atividades de manejos rápidos, reduzindo as alterações fisiológicas decorrentes do estresse da biometria.

Palavras-chave: produtos naturais, indução anestésica, recuperação, estresse oxidativo

ANESTHETIC POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OIL *Cymbopogon citratus* IN JUVENILES OF TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Abstract: The study aimed to evaluate different concentrations of *Cymbopogon citratus* essential oil (EOCC) for anesthetic induction and recovery in tambaqui *Colossoma macropomum* and verify its effects on biochemical and oxidative stress parameters. Two experiments were conducted. In experiment 1, fish (10.06 ± 0.31 cm and 9.9 ± 0.38 g) were exposed to different concentrations of EOCC (60, 80, 100, 120 mg/L), in addition to the alcohol control (water + 1173 μ L/L ethanol). EOCC was diluted in ethanol (1:10). For evaluation, the animals were induced individually. In the tests, 10 fish were used for each EOCC concentration evaluated and the fish were used only once. Anesthetic induction was carried out in containers containing 1L of water + different concentrations of EOCC and recovery in containers with 2L of water. All animals submitted to the anesthetic induction test with the EOCC reached the anesthesia stage and recovered. In experiment 2, tambaqui juveniles (N= 48, 10.06 ± 0.31 cm and 9.9 ± 0.38 g) were subjected to biometry under deep anesthesia at the best concentration obtained in experiment 1 (100 mg/L EOCC - N=24) and water control group (N=24). After 0, 30, 60 and 120 minutes of recovery, all fish were euthanized by sectioning the spinal cord. Tissue samples (liver, muscle and gills) were collected, frozen and stored at -20 °C for biochemical and oxidative stress analyses. In experiment 1, the data showed that the increasing concentration of essential oil proportionally decreased the time for anesthetic induction. There was no significant difference in recovery time between the oil concentrations used. Concentrations of 100 mg/L and 120 mg/L of EOCC showed better times for anesthetic induction in tambaqui juveniles (161 seconds = 2.68 minutes and 170.5s = 2.84 minutes), respectively. The alcohol control did not produce an anesthetic or sedative effect. EOCC did not cause mortality in animals exposed to essential oil in anesthetic induction tests. In experiment 2, the results indicate that the use of EOCC generally improved metabolic and oxidative stress parameters, stimulated the antioxidant activity of substances such as SOD and GSH in tissues, with less damage to lipid metabolism (TBARS). Therefore, the use of EOCC at a concentration of 100 mg/L can be recommended to anesthetize juvenile tambaqui in rapid handling activities, reducing physiological changes resulting from biometric stress.

Keywords: natural products, anesthetic induction, recovery, oxidative stress

3.1 INTRODUÇÃO

A investigação de substâncias naturais alternativas, que apresentam princípios ativos com funções biológicas variadas tem se intensificado na aquicultura ampliando as opções de produtos para uso como anestésicos em peixes (HOSEINI et al., 2018; SOUZA et al., 2019). Nesse contexto, as utilizações de anestésicos naturais têm aumentado, e os produtos oriundos de plantas como os óleos essenciais, extratos vegetais ou seus compostos isolados tem sido empregados em diferentes espécies de peixes (BALDISSEROTTO et al., 2018; SOUZA et al., 2019; AYDIN & BARBAS, 2020). Na aquicultura intensificou-se os estudos com produtos naturais extraídos de plantas como os óleos essenciais, extratos vegetais ou seus compostos isolados quanto à sua potencial atividade anestésica, em diferentes espécies de peixes (BOJINK et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018), um deles é o OECC, planta nativa de regiões tropicais do continente asiático, especialmente da Índia, pertencente a família Poaceae (OLADEJI et al., 2019) que já foi estudada em pesquisa com peixes ornamentais, como: acará bandeira, *Pterophyllum scallare* (OLIVEIRA et al., 2022), electric blue hap (*Sciaenochromis fryeri*) e labido yellow (*Labidochromis caeruleus*) (KIZAK et al., 2018). O citral que também é o composto majoritário do *Cymbopogon flexuosos e A. triphylla*, induziram a anestesia em juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (NETTO et al., (2017) e *Rhamdia quelen* (SANTOS et al., 2017). Esses resultados sugerem que os componentes do citral (geranial e neral) possuem propriedades anestésicas em diferentes espécies de peixes.

Apesar de serem utilizados para minimizar os efeitos do estresse após o manuseio, os anestésicos naturais também podem induzir algumas respostas indesejáveis (KANANI et al., 2013), como as bioquímicas (PARODI et al. 2014; SOUZA et al., 2018), a exemplo do aumento nas concentrações de glicose (PARK et al., 2008). Além disso, também foi observado dano tecidual oxidativo em truta arco-íris (VELISEK et al., 2011) e *Rhamdia quelen* (SOUZA et al., 2018).

O tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie nativa da região amazônica, que vem sendo utilizada como modelo experimental para novos candidatos a anestésicos naturais (FAÇANHA e GOMES, 2005; ROUBACH et al., 2005; INOUE et al., 2011; PÁDUA et al., 2013, BARBAS et al., 2017; SACCOL et al., 2016; BALDISSEROTTO et al., 2018). Sendo essas principais características que a elegem como adequada a rusticidade (ARAÚJO-DAIRIKI et al. 2018) resistência a doenças e a alterações na qualidade de água como mudança de temperatura, pH, amônia e oxigênio (BALDISSEROTTO, 2020).

Deste modo, considerando o destaque da produção de tambaqui, e a escassez de

informações sobre os efeitos do OECC nos parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo nos tecidos do tabaqui, este estudo teve o objetivo de avaliar diferentes concentrações do OECC para indução e recuperação anestésica em tabaqui e verificar seus efeitos sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo nos diferentes tecidos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do óleo essencial *Cymbopogon citratus* e composição química

A parte aérea de *Cymbopogon citratus* foi coletada em Belterra, no estado do Pará, norte do Brasil, e o óleo essencial foi extraído no Laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LABBEX-UFOPA) (Santarém- Pará – Brasil) por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Marca Vidrolabor) e tempo de extração foi fixado por 2 h (MING et al. 1996). Após a extração do OECC, este foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar, identificado com etiquetas e armazenadas à temperatura de 5° C, para posteriormente realização dos testes de indução anestésica. Uma alíquota do OE foi coletada para caracterização química que ocorreu por meio de cromatografia gasosa (Cromatógrafo Agilent Technologies, acoplado a um detector seletivo de massa Agilent Technologies), sendo os dados analisados no programa GCMS Prostrun Analysis.

3.2.2 Peixes

Juvenis de tabaqui ($10,06 \pm 0,31$ cm e $9,9 \pm 0,38$ g) foram obtidos de piscicultura comercial em Santarém, PA, Brasil. Os experimentos foram realizados no Laboratório Múltiplo de Produção de Organismos Aquáticos da UFOPA, onde os animais foram aclimatados em tanques de 1000 L com recirculação de água e aeração constante por 30 dias, sendo que durante este período receberam ração comercial onívora **Presence® Nutripiscis** com 32% de proteína bruta e 3.500 kcal kg⁻¹ de energia bruta, três vezes ao dia até a saciedade aparente. Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água diariamente (temperatura $25,9 \pm 0,1$ °C, pH $7,63 \pm 0,06$, oxigênio dissolvido $5,50 \pm 0,10$ mg/L, e condutividade elétrica $420,00 \pm 10,05$ µS.cm), com suspensão da alimentação 24h antes do início dos experimentos.

Esta pesquisa foi realizada com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética

no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará sob o número de registro 1120210126.

3.2.3 **Experimento 1.** Indução anestésica e recuperação de *Collossoma macropomum* exposto a diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Os peixes ($10,06 \pm 0,31\text{cm}$ e $9,9 \pm 0,38\text{ g}$) foram expostos a diferentes concentrações do óleo essencial 60, 80, 100 e 120 mg/L, (testes anteriores demonstraram que concentrações inferiores a 60 mg/L não anestesiavam tambaquis) além do controle álcool (água + 1173 μL etanol /L). Os animais foram induzidos a anestesia individualmente, sendo que o OE foi diluído em etanol (1:10). Nos testes foram utilizados 10 peixes para cada concentração de OE avaliada. Os peixes, foram utilizados apenas uma vez, onde cada peixe foi considerado uma unidade experimental. A indução anestésica foi realizada individualmente em recipientes de 2L (contendo 1L de água + OECC) e a recuperação em recipientes de 3L (contendo 2L de água sem anestésico). Todos os animais submetidos ao teste de indução anestésica com o OECC atingiram o estágio de anestesia e recuperação da anestesia.

Os tempos de indução anestésica foram verificados em segundos utilizando cronômetro, e os estágios foram baseados em observações comportamentais estabelecidos por SMALL (2003). Estágio 1 (perda parcial da reação aos estímulos externos- **sedação leve**). Estágio 2 (perda parcial do equilíbrio e natação errática- **sedação profunda**) e Estágio 3 (perda total do equilíbrio e sem resposta a estímulos táteis - **anestesia profunda**). O tempo máximo de observação para indução anestésica foi de 30 min. Após os testes de indução anestésica, os peixes foram transferidos para recipientes sem anestésicos (somente água) para avaliação do tempo de recuperação em segundos, que foi caracterizado pelo retorno à natação normal e reação a estímulos externos com uso de bastão de vidro ao tocar os animais. Após a recuperação os animais foram transportados para caixas de água de 500L com areação constante, separados por tratamentos e avaliada a sobrevivência após 24h.

3.2.4 **Experimento 2.** Respostas fisiológicas do *Collossoma macropomum* durante diferentes tempos de recuperação após anestesia com óleo essencial *Cymbopogon citratus*.

Juvenis de tambaqui (N= 48, $10,06 \pm 0,31\text{cm}$ e $9,9 \pm 0,38\text{ g}$), foram submetidos à biometria sob anestesia profunda na melhor concentração obtida no experimento 1 (100 mg/L OECC, Tabela 1) e grupo controle água (somente água). Após 0, 30, 60 e 120 minutos de

recuperação, (N= 24 peixes testados com OECC e N= 24 com grupo controle) foi realizada a eutanásia de todos os peixes por meio de atordoamento seguido de secção medular de acordo com a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2013). Amostras de tecidos (fígado, músculo e brânquias) foram coletadas e acondicionadas em tubos de 1,5 mL, congeladas e armazenadas a -20 °C para as análises bioquímicas e de estresse oxidativo.

3.2.5 Parâmetros bioquímicos

Para avaliar os níveis de metabólitos, amostras de tecidos (fígado, brânquias e músculo) foram fragmentadas individualmente em uma placa de Petri gelada e posteriormente homogeneizado com Ultra-Turrax®, T25basic com uma ferramenta de dispersão S25N-8G, IKA®-Werke, com 7,5 vol. (p/v) de ácido perclórico 0,6 N gelado e neutralizado com o mesmo volume de 1 M KHCO₃. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados (30 min, 4000 x g, 4 °C), e os sobrenadantes foram recuperados em alíquotas e armazenados a -20 °C. Os parâmetros bioquímicos (glicose, lactato, proteína total e triglicerídeos) foram determinados com kit comercial Labtest® (Belo Horizonte – MG Brasil) (Glicose PAP Liquiform Ref. 84; Lactato Enzimático Ref. 138; Proteínas Totais Ref. 99; Triglicerídeos Liquiform Ref. 87) com adaptações para leitura em microplacas de 96 poços. A amônia tecidual foi determinada pelo método do salicilato-hipoclorito, de acordo com (VERDOUW et al., 1978). Todos os ensaios foram executados na Microplate Reader (Diatek DR-200B, DiaTek Instruments) usando o software KCjunior™.

A outra porção das amostras de tecidos foi homogeneizada com tampão fosfato de sódio 0,3 M + KCl 140 mM pH 7,4 na proporção de 1:10 para análise do estresse oxidativo. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram estimados de acordo com o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo Ohkawa et al. (1979) adaptado por BALDISSERA et al. (2016), sendo os resultados expressos em nmol de MDA g tecido. O ensaio da atividade da SOD foi baseado pela inibição da oxidação do pirogalol pela SOD conforme descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972) e expressa como Unidade SOD mg proteína. Os níveis de GSH foram determinados como SEDLAKE e LINDSAY (1968) pela reação de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e cisteína como curva padrão e valores (expresso como µmol mg de proteína).

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro Wilk para normalidade e de Levene para homocedasticidade. Foi realizada análise de variância (ANOVA) One way e análise de regressão potência (Experimento 1) e ANOVA two way (Experimento 2 - tempo e tratamento). Os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$) por meio do software Sigma Plot v.11.

3.3 Resultados

O OECC apresentou rendimento superior a 1%. Os constituintes químicos majoritários foram (geranial, neral, mirceno e geraniol) (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento e componentes químicos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Constituintes	RI _{calc}	RI _{Lit}	Rendimento %
Geranial	1274	1264	45,17
Neral	1244	1235	34,44
Mirceno	991	988	9,7
Geraniol	1255	1249	2,96
Isogeranial	1182	1178	1,94
Z- isocitral	1164	1160	1,3
Linalool	1100	1095	0,71
6-metil-5-Hepten-2-ona	985	981	0,47
E-β-Ocimeno	1047	1036	0,42
Acetato de geranila	1384	1379	0,33
Citronelool	1229	1223	0,29
E- isocitral	1144	1177	0,29
Perileno	1102	1102	0,23
2-Undecanona	1294	1293	0,22
Citronelal	1152	1148	0,21
Trans-chrysanthemol	1149	1143	0,18
Isopinocampheol	1195	1192	0,16
Total			99,02%

RI_{calc} = tempo de retenção calculado; RI_{lit} = tempo de retenção da literatura

3.3.1 Experimento 1- Indução anestésica e recuperação

O controle álcool não apresentou efeito anestésico e nem sedativo. As concentrações de 100 e 120 mg/L de OECC apresentaram melhores tempos para a indução anestésica (Tabela 2) em juvenis de tambaqui (161 segundos = 2,68 minutos e 170,5s = 2,84 minutos), respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre essas concentrações ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa nos tempos de recuperação entre as concentrações de OECC testadas ($p > 0,05$). Não houve mortalidade de peixes durante a anestesia, recuperação

e 24 horas após os testes.

Tabela 2. Tempo de indução anestésica e recuperação (em segundos) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) em diferentes concentrações na água.

OECC (mg/L)	Indução Anestésica			Recuperação
	Sedação leve	Sedação profunda	Anestesia profunda	Total recuperação do equilíbrio e capacidade de nado
OECC 60	42,60±7,33 ^a	109,2±6,76 ^a	400,1±50,67 ^a	156,7±25,68 ^a
OECC 80	25,90±5,17 ^b	90,20±4,78 ^a	229,90±12,63 ^b	139,4±23,46 ^a
OECC 100	27,86±2,66 ^b	58,70±2,69 ^b	161,00±4,44 ^c	113,1±24,01 ^a
OECC 120	32,60±2,28 ^{ab}	48,20±2,45 ^b	170,50±6,43 ^c	126,9±18,61 ^a

Letra minúscula diferença significativa entre linhas da mesma coluna; ANOVA ONE WAY, $p < 0.05$ teste de Tukey.

Os dados mostraram que concentrações crescentes de óleo essencial de *C. citratus* diminuiu proporcionalmente o tempo para a indução anestésica (Figura 1).

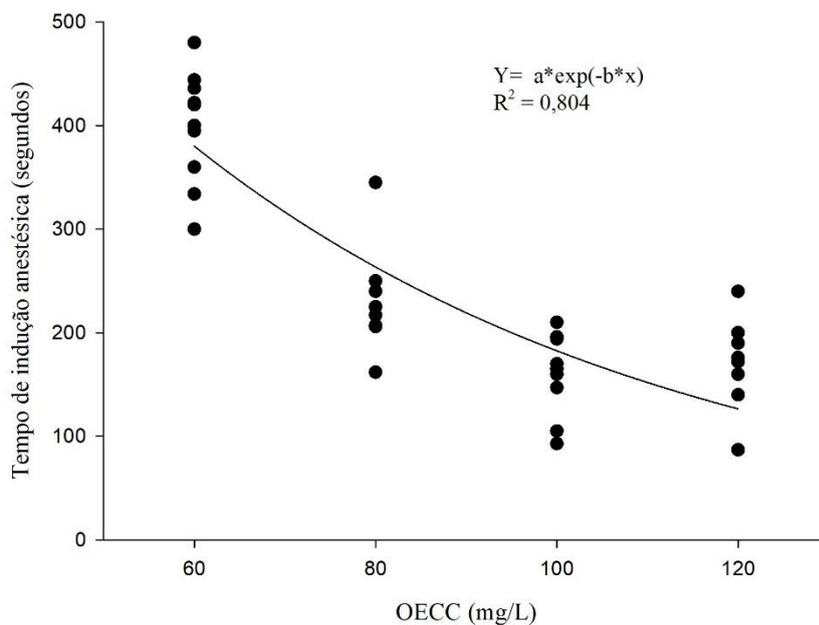


Figura 1. Tempo de indução anestésica dos juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

3.3.2 Experimento 2- Parâmetros Bioquímicos

Nos parâmetros bioquímicos hepáticos, houve um aumento de glicose ao longo do tempo nos peixes não anestesiados, apresentando pico em 60 minutos. Já os peixes submetidos ao OECC essa redução dos níveis ocorreu a partir dos 60 min, onde foi menor significativamente em comparação ao grupo controle. Os níveis de triglicerídeos hepático foram menores em 120 min de recuperação em comparação ao tempo 0 min nos peixes anestesiados, enquanto nos peixes do controle não houve mudanças significativas ao longo do tempo de recuperação (Tabela 3).

Não houve diferença significativa nos níveis de proteína hepática nos peixes anestesiados, já para peixes não anestesiados houve redução dos níveis a partir de 60 minutos ($p < 0,05$). Foi observado aumento significativo nos níveis de amônia tecidual no fígado em 0, 30 e 120 min para anestesiados em comparação com peixes não anestesiados. Os níveis de lactato hepático não alteraram significativamente nos tempos de recuperação para os peixes não anestesiados, no entanto para os peixes anestesiados foi menor o nível de lactato no tempo 0 min em comparação ao grupo controle e foi maior em 120 minutos dentro do tratamento (Tabela 3).

Os níveis de glicose e triglicerídeos muscular foram significativamente menores em 30 min de recuperação nos peixes anestesiados em comparação ao grupo controle (não anestesiado) no mesmo tempo de recuperação. Não foi observada diferença significativa da proteína muscular nos peixes anestesiados, no entanto no tempo 0 min de recuperação foi menor significativamente que o grupo controle ($p < 0,05$). Foi observado aumento significativo dos níveis de amônia no tecido muscular nos tempos 60 e 120 min para peixes anestesiados em comparação ao grupo controle. No entanto em 0 min de recuperação, os níveis em peixes com emprego do OECC foi significativamente menor comparado ao controle. Para os valores de lactato no músculo não houve mudanças ao longo do tempo tanto para peixes anestesiado, quanto não anestesiados, contudo menores níveis deste parâmetro foram registrados em 30, 60 e 120 min de recuperação nos peixes anestesiados, comparados ao grupo controle (Tabela 3).

No tecido branquial, os níveis de glicose foram maiores nos tempos 0 e 30 min de recuperação no peixes anestesiados em comparação com o grupo controle, no entanto em peixes anestesiados não houve diferença significativamente ao longo do tempo de 120 min de recuperação. Valores de triglicerídeos e proteína branquial foram maiores em 30 min de recuperação em comparação ao grupo controle. Quanto aos níveis de amônia nas brânquias foi observado menores valores em 30 e 60 min de recuperação em peixes anestesiados em comparação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3. Metabólitos em tecidos de tambaqui, *Colossoma macropomum*, após indução anestésica com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) 100 mg/L adicionado na água (*Anestesiado*) e grupo controle (*Não anestesiado*), com diferentes tempos de recuperação.

Grupo	Glicose	Triglicerídeos	Proteína	Amônia tecidual	Lactato
<i>Não anestesiado</i>			<i>Fígado</i>		
0 min	268,75±34,99 ^c	10,72±3,50 ^a	14,44±1,18 ^a	543,75±25,65 ^b	9,35±0,92 ^a
30 min	262,72±20,69 ^c	12,28±3,13 ^a	11,97±1,90 ^{ab}	423,94±72,43 ^b	6,68±1,50 ^a
60 min	499,18±72,16 ^a	10,61±2,93 ^a	10,84±2,63 ^b	491,46±65,67 ^b	6,70±2,47 ^a
120 min	358,79±57,36 ^b	10,49±1,98 ^a	9,94±1,81 ^b	849,59±122,31 ^a	6,02±1,07 ^a
<i>Anestesiado</i>					
0 min	377,99±50,57 ^{a*}	10,30±2,29 ^b	12,12±1,35 ^{a*}	930,33±119,18 ^{b*}	6,58±2,13 ^{b*}
30 min	420,81±25,90 ^{a*}	16,68±4,28 ^{a*}	13,93±1,83 ^a	530,97±99,75 ^{c*}	8,79±2,91 ^b
60 min	331,37±47,17 ^{b*}	14,46±5,59 ^a	14,51±1,24 ^{a*}	399,12±41,79 ^d	9,69±3,57 ^{b*}
120 min	316,82±51,40 ^b	8,48±0,74 ^c	11,97±1,60 ^a	1138,28±36,64 ^{a*}	10,74±2,25 ^{a*}
			<i>Músculo</i>		
<i>Não anestesiado</i>					
0 min	9,91±5,26 ^c	8,96±1,76 ^b	17,81±4,82 ^a	1252,39±33,51 ^a	65,75±14,93 ^a
30 min	26,17±6,85 ^a	18,33±1,25 ^a	12,92±1,23 ^b	260,26±46,46 ^c	71,57±4,32 ^a
60 min	7,18±1,76 ^c	9,81±2,50 ^b	11,51±2,27 ^b	648,58±65,79 ^b	67,54±11,69 ^a
120 min	17,02±2,65 ^b	10,38±2,95 ^b	12,12±3,50 ^b	216,42±34,36 ^{cd}	69,86±4,92 ^a
<i>Anestesiado</i>					

0 min	16,85±4,64 ^{a*}	8,65±1,58 ^c	13,75±3,58 ^{a*}	485,18±73,43 ^{c*}	56,78±2,84 ^a
30 min	8,50±0,45 ^{b*}	9,17±1,97 ^{b*}	9,92±2,09 ^a	340,22±76,23 ^d	50,94±4,85 ^{a*}
60 min	11,38±2,99 ^b	12,62±4,28 ^{ba}	12,89±1,75 ^a	1325,96±199,64 ^{a*}	45,28±4,41 ^{a*}
120 min	12,67±3,08 ^b	14,24±2,21 ^{a*}	12,55±1,04 ^a	943,89±88,69 ^{b*}	56,58±7,98 ^{a*}

Brânquias

Não anestesiado

0 min	5,67±1,59 ^c	11,45±2,30 ^b	10,56±3,60 ^a	450,69±61,02 ^b
30 min	18,24±4,86 ^b	17,56±2,98 ^a	11,97±2,75 ^a	634,13±73,59 ^a
60 min	23,49±2,40 ^b	20,19±4,66 ^a	11,94±2,93 ^a	587,61±106,72 ^a
120 min	35,467±8,67 ^a	17,50±5,54 ^a	10,65±2,34 ^a	590,71±93,10 ^a

Anestesiado

0 min	24,61±4,26 ^{a*}	17,667±6,84 ^{b*}	13,685±2,31 ^{a*}	737,05±50,22 ^{a*}
30 min	26,09±4,49 ^{a*}	15,513±2,38 ^b	11,545±1,68 ^{ab}	439,33±44,62 ^{b*}
60 min	25,64±4,88 ^a	23,275±2,62 ^a	9,070±1,91 ^b	465,07±77,05 ^{b*}
120 min	33,33±8,57 ^a	16,803±5,32 ^b	9,237±2,36 ^b	491,77±57,45 ^b

Valores estão expressados em médias ± desvio padrão. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de recuperação dentro do mesmo tratamento; * indica diferenças significativas entre animais não anestesiado (grupo controle) e submetidos a anestesia no mesmo tempo de recuperação. ANOVA TWO WAY teste de tukey p<0.05. Glicose, lactato e triglicérides, são expressos em µmol/g de tecido. Amônia tecidual é expressa em µM/ g de tecido e proteína mg de proteína/ g de tecido.

3.3.3 Parâmetros de Estresse Oxidativo

Ambos os tratamentos (anestesiado e não anestesiado) apresentaram menores níveis de TBARS no fígado em 120 min comparado ao tempo de 0 min de recuperação. No entanto no tempo de 0 min foi observado menores níveis de TBARS nos peixes anestesiados, quando comparados ao grupo não anestesiado (Figura 2).

Não houve diferença significativa nas atividades de SOD e GSH no fígado ao longo do tempo de recuperação e entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação, com médias SOD ao longo de 120 min ($1,95 \pm 0,17$) (U SOD/ mg de proteína) e GSH ao longo de 120 min ($2,31 \pm 0,18$) ($\mu\text{mol GSH/ mg de proteína}$).

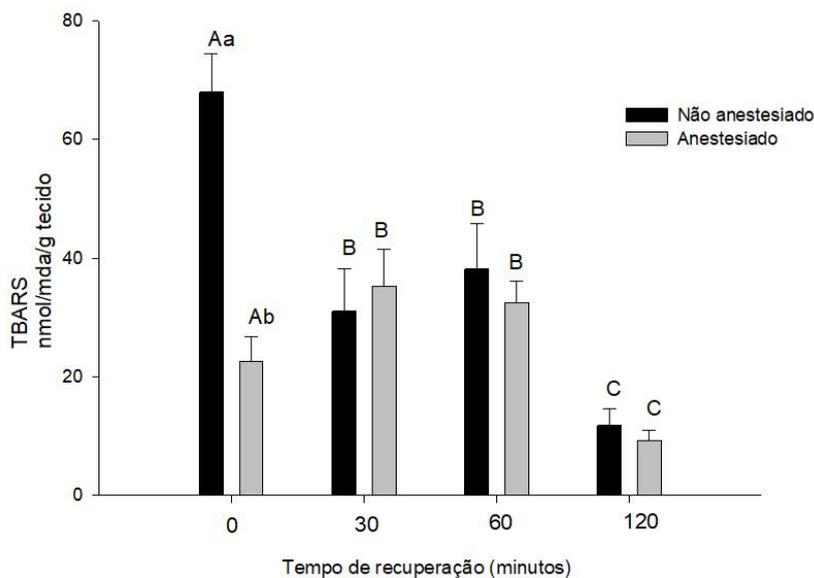


Figura 2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no fígado de tambaqui aos 0, 30, 60 e 120 minutos após a recuperação da anestesia com 100 mg/L do OECC (*Anestesiado*) e grupo controle (*Não anestesiado*). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo tratamento. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro do mesmo tempo por ANOVA two-way e teste de Tukey, $p < 0,05$.

No músculo os níveis de TBARS foram menores em 60 min de recuperação para ambos os tratamentos, em comparação ao tempo 0 min de recuperação, contudo foi maior em 30 min para peixes anestesiados comparados ao controle (Fig 3. I). A atividade de SOD no músculo foi maior nos tempos de 0 e 30 min de recuperação para peixes anestesiados em comparação ao grupo controle, porém menor em 120 min em comparação aos peixes não anestesiados (Fig 3. II).

Para a atividade de GSH no músculo foram menores em 120 min de recuperação para

ambos os tratamentos, em comparação ao tempo 0 min de recuperação. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos dentro dos tempos de recuperação avaliados (Fig 3. III).

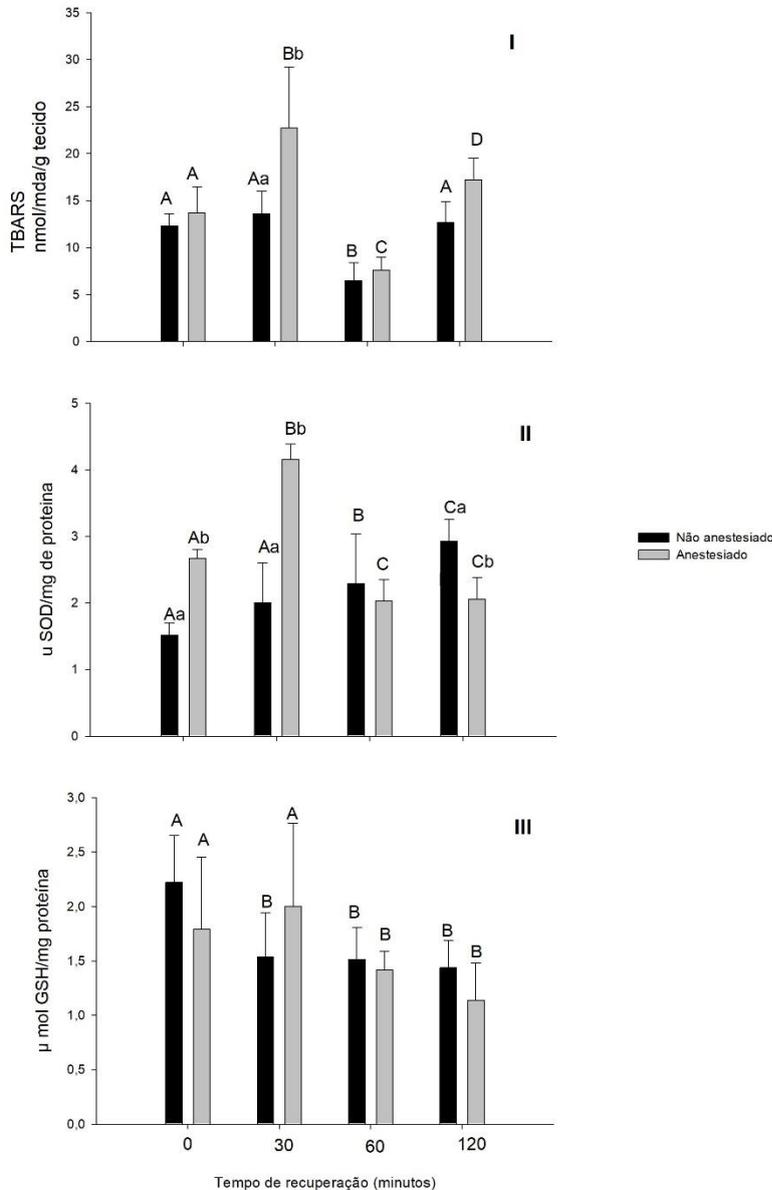


Figura 3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (I), atividade da superóxido dismutase SOD (II) e níveis de glutathiona reduzida GSH (III), no músculo de tambaqui aos 0, 30, 60 e 120 minutos após a recuperação da anestesia com 100 mg/L do OECC (Anestesiado) e grupo controle (*Não anestesiado*). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo tratamento. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro do mesmo tempo por ANOVA two-way e teste de Tukey, $p < 0,05$.

Os níveis de TBARS nas brânquias foram maiores significativamente a partir de 60 min

nos peixes não anestesiados em comparação ao tempo de 0 min de recuperação. Não houve diferença significativa ao longo de duas horas de recuperação nos peixes anestesiados, no entanto em todos os tempos avaliados os peixes anestesiados apresentaram menores níveis de TBARS em comparação aos não anestesiados (Fig 4 I).

Para a atividade de SOD nas brânquias, não houve diferença significativa ao longo de duas horas de recuperação nos peixes não anestesiados, no entanto nos peixes submetidos a anestesia houve maior atividade de SOD a partir de 60 min em comparação ao tempo 0 e 30 min de recuperação (Fig 4 II). Quanto a atividade de GSH não houve diferença significativa ao longo de 2 horas de recuperação em ambos os tratamentos, porém houve maior atividade de GSH nos peixes não anestesiados no tempo 0 min de recuperação, comparados ao grupo anestesiado (Fig 4 III).

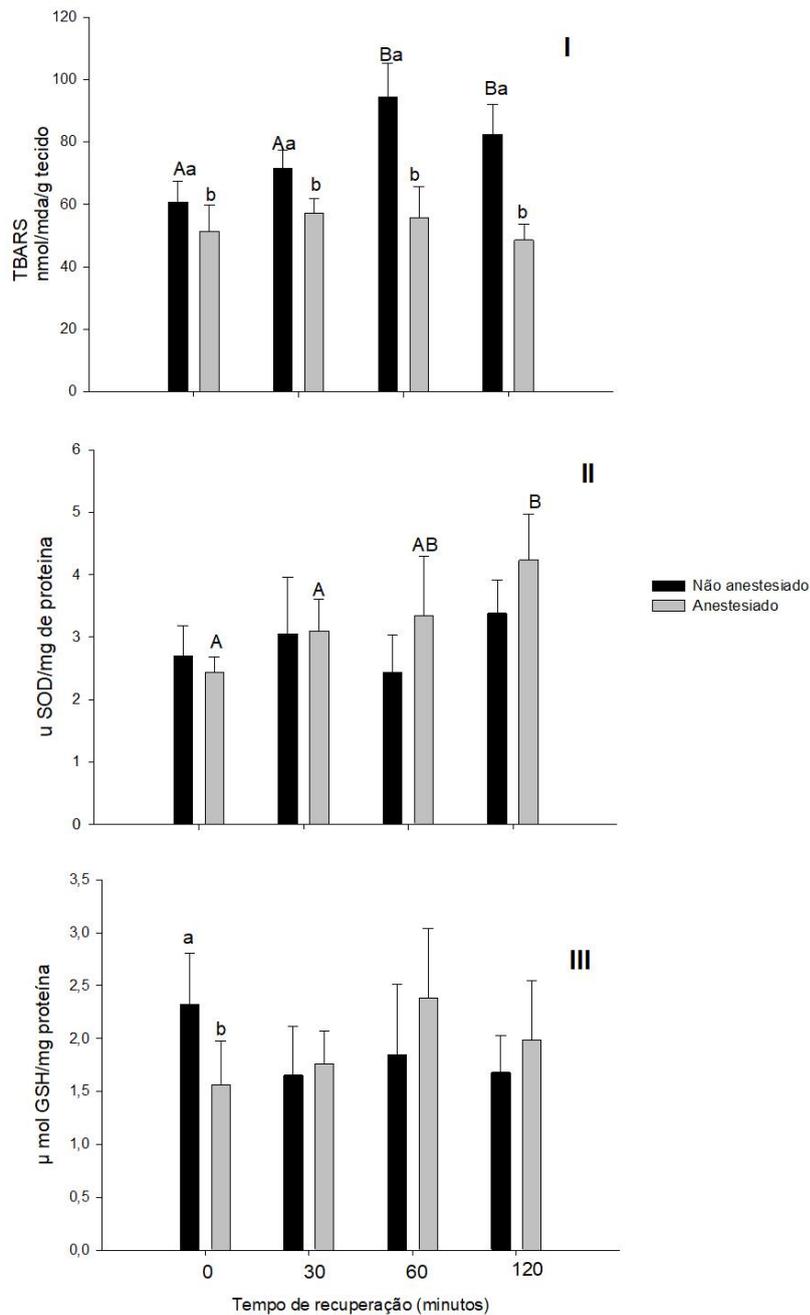


Figura 4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (I), atividade da superóxido dismutase SOD (II) e níveis de glutathiona reduzida GSH (III) na brânquia de tambaqui aos 0, 30, 60 e 120 minutos após a recuperação da anestesia com 100 mg/L do OECC (*Anestesiado*) e grupo controle (*Não anestesiado*). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo tratamento. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro do mesmo tempo por ANOVA two-way e teste de Tukey, $p < 0,05$.

3.4 Discussão

No presente estudo identificou-se a composição química do OECC, composto majoritariamente pelo citral (79,61 %), em outros estudos como (OLIVEIRA et al., 2022) também encontraram o citral (73,56 %) e (KIZAK et al., 2018) citral (75,74%). Os óleos essenciais de *L. alba* e *A. triphylla*, que também são compostos majoritariamente por citral, foram eficazes como anestésicos em jundiá *Rhamdia quelen* (BECKER et al., 2018; SOUZA et al., 2018) e tambaqui (SILVA et al., 2019, MAIA et al. 2019), suas propriedades podem ser atribuídas ao mecanismo de ação, que através da inibição do sistema receptor GABA, demonstrou efeitos sedativos e ansiolíticos em camundongos e zebrafish (COSTA et al., 2011; HACKE et al., 2020).

Nenhuma mortalidade foi observada durante e 24 h após os procedimentos. A indução e recuperação anestésica com OECC em juvenis de tambaqui foram melhores nas concentrações 100 e 120 mg/L (160,8 segundos e 170,4 segundos e recuperação 112,8 segundos e 127,2 segundos), respectivamente. Durante a anestesia, as maiores concentrações de OECC induziram a anestesia mais rapidamente, corroborando com resultados observados por (TONI et al., 2014), que estudaram o efeito anestésico do óleo essencial de *Lippia alba* em *Rhamdia quelen*, já com uso de óleo essencial de *C. flexuosus* a 300 µl/L proporcionou anestesia profunda para tambacu e jundiá (LIMMA-NETTO et al., 2016; SANTOS et al., 2017), e 600 µl/L para juvenis de tilápia do Nilo (LIMMA-NETTO et al., 2017). As diferenças nas concentrações efetivas dos óleos essenciais (quimiotipo citral) podem ser explicadas pelas diferenças de espécie e idade dos peixes (BRANDÃO et al., 2021).

A recuperação é geralmente mais rápida para concentrações mais baixas de anestésico, e torna-se mais longa à medida que aumentam as concentrações (HOSEINI et al., 2021). Entretanto, curiosamente as diferentes concentrações de OECC avaliadas não afetaram o tempo de recuperação, corroborando com registrados com juvenis de tambaqui por (MAIA et al., 2019), e com o uso de OE de *Lippia alba* na concentração de 200–500 µL L⁻¹ (SACCOL et al., 2017) e *L. alba* (citral 42%) 50–300 µL L⁻¹ (BATISTA et al., 2018), respectivamente, para a mesma espécie de peixe.

Alterações do metabolismo bioquímico plasmático e tecidual como (glicose, lactato e triglicerídeos) podem ser desencadeadas por uma resposta secundária ao estresse, para restabelecer a homeostase, durante e após procedimentos estressantes (BARTON, 2002; PANKHURST 2011). Com foco nos parâmetros bioquímicos teciduais em peixes, associados a anestesia a literatura ainda é escassa.

No presente estudo a redução dos níveis de glicose hepática a partir de 60 min de recuperação, comparada ao grupo controle, corroboram com resultados encontrados por (ZEPPENFELD et al., 2014), em que a adição do OE de *A. triphylla* (citral 72,3%) reduziu os níveis de glicose do fígado e músculo em peixes *Rhandia quelen* anestesiados. O aumento dos níveis de glicose ocorrida no grupo controle aos 60 min de recuperação, pode ser explicado pelo estresse causado aos animais sem anestesia, que geram processos metabólicos para atender a demanda energética do manuseio biométrico (VELISEK et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019)

No tecido muscular também foi observado menores valores de glicose, associados a maiores níveis de triglicerídeos em peixes anestesiados, isso sugere que o metabolismo de carboidratos pode ter sido a principal fonte de energia. Esta situação foi relatada a seguir por outros autores com uso de óleos essenciais em diferentes espécies de peixes. Entre eles, BOAVENTURA et al., (2022) avaliaram o uso de óleo essencial *Thymus vulgaris* (quimiotipo timol) como anestésico para tambaqui, e observaram que aqueles anestesiados apresentaram o maior nível de triglicerídeos. FENG et al. (2011) estudaram os efeitos do uso de diferentes concentrações de óleo de cravo e MS-222 como anestésicos durante o manejo de juvenis de *Acipenser baerii* e também observaram um aumento nos níveis de triglicerídeos após indução anestésica para juvenis anestesiados com 180 mg/L de óleo de cravo e com 140 mg/L e 160 mg/L de MS-222.

Por outro lado, menores níveis de triglicerídeos hepático foram observados em peixes anestesiados no presente estudo, resultado semelhante ao encontrado com o uso de óleo essencial de *Hesperozygis ringens* como anestésico para tambaqui durante manipulação biométrica (FERREIRA et al., 2023), também em peixes anestesiados com óleo essencial de manjerição 800 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (VENTURA et al. 2021) . Isso demonstra uma modulação lipídica entre o fígado e a síntese de outras fontes lipídicas metabolizáveis como fosfolipídios e colesterol (JUN et al., 2015), com isso pode-se sugerir que o metabolismo dos triglicerídeos podem ter sido preservados na mobilização energética (VELISEK et al., 2005).

Em situações onde ocorre hipóxia transitória pela exposição prolongada ao anestésico, os níveis de lactato resultante das reações anaeróbicas da glicose é elevado (OMLIM e WEBER, 2010), isso pode explicar os níveis mais elevados de lactato hepático nos tempos de 120 min em relação a 0 min de recuperação, nesse sentido (IVERSEN et al., 2003; INOUE et al., 2011), também observaram maiores níveis de lactato (metabolismo anaeróbico) em tambaqui e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) com uso de eugenol e óleo de cravo, respectivamente, em comparação ao grupo controle (sem anestésico). Resultados semelhantes, também foram encontrados em truta arco-íris usando óleo de cravo (WAGNER et al., 2003) e jundiás (

Rhamdia quelen) anestesiado com óleo essencial de *Lippia alba* (TONI et al., 2014), demonstrando que a indução anestésica pode levar à hipóxia transitória (SOUZA et al., 2017).

O estresse pode afetar o metabolismo das proteínas, inibindo a produção e promovendo atividade catabólica nas proteínas (MOMMSEN et al., 1999, VAN DER BOON et al., 1991) usando as proteínas como fonte de energia (ALURU e VIJAYAN, 2009; RIBEIRO et al., 2019). No presente estudo houve depleção do metabolismo protéico nos peixes do grupo controle, comparados aos peixes anestesiados com OECC tanto no fígado quanto no músculo, o que corroborou com resultados de (ZEPPENFELD et al, 2014), em que jundiás do grupo controle apresentaram baixos níveis de proteína no fígado em comparação com uso de 40 µL/L de EO de *A. triphylla* (citral 72%), demonstrando a função protetora do óleo essencial na preservação das proteínas. A manutenção dos níveis de proteínas nos peixes anestesiados em até 120 min sugere que estas foram preservadas para outras finalidades vitais do organismo (BECKER et al., 2016), haja vista que as vias do metabolismo da glicose foram suficientes para atender à demanda energética na recuperação pós manejo biométrico.

Nas brânquias a dinâmica do metabolismo da proteína foi o inverso, enquanto não tivemos alterações significativas nos níveis de proteína no grupo controle, houve redução dos níveis de proteínas nos peixes anestesiados, associados a baixos níveis de amônia nas brânquias. Durante a anestesia profunda os peixes passam por condição análoga à hipóxia devido à diminuição da taxa de ventilação. A reoxigenação dos tecidos ocorre somente na recuperação, que geralmente é acompanhada por danos oxidativos (GRESSLER et al., 2014 ; VELISEK et al., 2011). Isto é, alterações nos batimentos operculares e na frequência cardíaca podem prejudicar a passagem de água e sangue pelas brânquias e a excreção de amônia (INOUE et al., 2011 ; RIBEIRO et al., 2016). Assim pode-se sugerir que a redução dos níveis de proteína nas brânquias deve-se ao uso para atender a demanda energética, e os níveis baixos de amônia nos peixes anestesiados com OECC, indicam altas taxas de transaminação em resposta às condições de estresse. Infelizmente, não foi possível avaliar outros parâmetros bioquímicos importantes, como níveis plasmáticos de cortisol e glicogênio, devido ao tamanho corporal dos juvenis utilizados para comercialização. No entanto, as análises de estresse oxidativo e de avaliação do dano lipídico TBARS do presente estudo, contribuiu para uma visão mais compreensiva dos resultados.

O aumento dos níveis muscular de TBARS aos 30 min de recuperação após a anestesia do tambaqui com OECC seria um indicativo de dano lipídico causado por este anestésico, que pode causar danos à camada fosfolipídica das células e ao metabolismo das proteínas. No entanto, houve ativação do sistema antioxidante através do aumento significativo da atividade

da SOD ao mesmo tempo, o que pode-se inferir que o aumento da atividade da SOD, é uma tentativa de minimizar a produção de radicais livres, condição evidenciada pela elevação dos níveis de TBARS. A SOD é uma das primeiras barreiras enzimáticas antioxidantes a combater EROs (SLANINOVA et al., 2009). Por outro lado os níveis de TBARS no fígado no tempo 0 min foi menor nos peixes anestesiados que o grupo controle, enquanto que não houve diferenças significativas nas atividades de SOD e GSH hepático, demonstrando um status oxidativo equilibrado, não estimulando o sistema antioxidante. Níveis mais baixos de TBARS também foram vistos no fígado de jundiás com o óleo essencial de *L. alba* (AZAMBUJA et al., 2011) fígado e músculo de jundiás com OE de *A. triphylla*. (ZEPPEFELD et al., 2014) e jundiás anestesiado com 300 µL L⁻¹ de OE dos quimiotipos *L. alba* citral e linalol (SOUZA et al., 2018).

As brânquias estão mais expostas ao meio ambiente, portanto, são as primeiras a ter contato com substâncias presentes na água. Em condições de manuseio ou transporte que geram estresse, as brânquias também podem sofrer alterações para adaptar-se as novas condições do ambiente, garantindo a manutenção de suas funções (BRANDÃO et al., 2021). No presente estudo, peixes anestesiados tiveram menores níveis de TBARS nas brânquias em todos os tempos avaliados de recuperação, comparados ao grupo controle. Já, BALDISSERA et al., 2019 estudaram o desequilíbrio bioenergético branquial de *L. alexandri* submetido à condição de hipóxia seguida de reoxigenação e encontraram níveis mais elevados de EROs nas brânquias durante a reoxigenação, o que não ocorreu no presente estudo.

YOUSEFI et al., (2022) demonstraram que a anestesia de *O. niloticus* com timol e eugenol (30 e 80 mg L⁻¹) mostrou menores os níveis de GSH comparados com grupo controle (sem anestésico), evidenciando sua função como antioxidante. O aumento significativo da atividade do GSH no músculo em 0 e 30 min de recuperação, esta relacionado com a atividade de SOD no mesmo tempo avaliado, uma vez que a função do GSH é neutralizar e remover substâncias citotóxicas produzidos por SOD a partir de 0 min de exposição.

3.5 Conclusão

O uso do OECC 100 mg/L é recomendado para anestésiar juvenis de tambaqui em atividades de manejos rápidos, uma vez que promoveu anestesia em tempo adequado menos de 3 minutos e recuperação em tempo inferior a 10 minutos, não provocou mortalidade nos animais expostos ao óleo essencial, e de maneira geral melhorou os parâmetros metabólicos e de estresse

oxidativo, estimulou a atividade antioxidante de substâncias como SOD e GSH nos tecidos, com menores danos ao metabolismo lipídico (TBARS), portanto reduzindo os efeitos deletérios da exposição ao manejo biométrico.

3.6 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo INCT-ADAPTA 2 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas - FAPEAM).

3.7 Referências Bibliográficas

AHMAD, I.; TANG, L.; PHAM, H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 270, n. 2, p. 517-521, 2000.

ALURU, N.; & VIJAYAN, M. M. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. **General and comparative endocrinology**, 164(2-3), 142-150, 2009.

ARAÚJO-DAIRIKI, T. B.; CHAVES, F. C. M.; & DAIRIKI, J. K. Seeds of sachainchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae) as a feed ingredient for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). **Acta Amazonica**, v.48, p.32-37, 2018

AYDIN, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v.520, p.734999, 2020.

AZAMBUJA, C. R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A. P. K. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, 319(1-2), 156-161, 2011.

BASTOS, J.F.; MOREIRA, I.J.; RIBEIRO, T.P. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 106, 331–337, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x>

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BALDISSEROTTO, B. et al. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 501, 224-229, 2019.

BALDISSERA, M.D.; GONÇALVES, R.A.; SAGRILLO, M.R. et al. Effects of treatment with the anti-parasitic drug diminazene aceturate on antioxidant enzymes in rat liver and kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 389, (429-438) 2016. 10.1007/s00210-016-1212-z

- BALDISSEROTTO, B.; Barata, L. E., Silva, A. S. 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, 2018.
- BARBAS, L. A. L.; HAMOYB, M.; MELLO, V. J. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. **Aquaculture**, v. 479, p. 60–68, 2017
- BARTON, B.A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42, (517-525), 2002 .
- BATISTA, E.; BRANDÃO, F. R.; MAJOLO, C. et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, 495, 545-549. 2018
- BECKER, A.J.; FOGLIARINI, C.O.; SOUZA, C.F. et al. Ventilatory Frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: A comparative approach between different essential oils. **Revista Brasileira de Zootecnia** 47:e20170185. 2018
<https://doi.org/10.1590/rbz4720170185>
- BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; ZEPPENFELD, C.C. 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**, p.1-9, 2016.
- BOAVENTURA, T. P.; DOS SANTOS, F. A. C.; DE SENA SOUZA, A. et al . Thymol and linalool chemotypes of the essential oil of *Thymus vulgaris* (thyme) as anesthetic for *Colossoma macropomum*: Physiology and feed consumption. **Aquaculture**, 554, 738161. 2022
- BOIJINK, C. L.; QUEIROZ, C. A.; CHAGAS, E. C. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 457, p. 24–28, 2016.
- CONCEA (2013) Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, Brasília.
- COSTA, C.R.A.; Kohn, D.O.; De Lima, V.M. et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal Ethnopharmacol** 137:828–836. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.003>
- CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radicals biochemistry. Oxford academic 49, 481–493. 1994 doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625
- FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research** 36, 1056–1061. 2005
- FERREIRA, A. L.; SOUZA, A. D. S.; SANTOS, F. A. C. D. et al. *Hesperozygis ringens* essential oil as an anesthetic for *Colossoma macropomum* during biometric handling. **Aquaculture** 221 (1–4), 549–566. 2023

- GRESSLER, L.T.; RIFFEL, A.P.K.; PARODI, T.V. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'H'erit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research** 45, 1061–1072. 2014 <https://doi.org/10.1111/are.12043>
- HOSEINI, S. M.; MIRGHAED, A.T.; PAGHEH, E. et al. Anesthesia of rainbow trout with citronellal: efficacy and biochemical effects. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology** 2021:1–11. 2021 <https://doi.org/10.1002/jez.2560>
- HOSEINI, S.M.; TAHERI MIRGHAED, A.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Rev. Aquac.** 2018 0. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>
- INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, O.T. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta amazonica**, 41 (2), 327 – 332. 2011
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R. S. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 549-566, 2003.
- JUN, Q.; HONG, Y.; HUI, W. et al. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. **Aquaculture Research**, v.46, n.2, p.335-345, 2015.
- KANANI, H.G.; SOLTANI, M.; MIRZARGAR, S.S. Effect of tricainemethanesulfonate (MS222), clove oil and electro-anaesthesia on respiratory burst activity in whole blood and serum alternative complement response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), during the narcosis stage. **Fish and Shellfish Immunology** 34, 692–696. 2013 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.021>
- KIZAK, V., CAN, E., CAN, S. S., & ÖZÇİÇEK, E.. Anesthetic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil as a herbal agent in two ornamental fish species. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 70. 2018
- LIMMA-NETTO, J. D.; SENA, A. C.; & COPATTI, C. E. Óleos essenciais de *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon flexuosus* na sedação, anestesia e recuperação de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* fêmea). **Boletim do Instituto de Pesca**, 42(3), 727-733. 2016
- ŁUCZAJ, W.; GȨGOTEK, A.; & SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Biology and Medicine of Free Radicals**, 111, 87-101. 2017
- MAIA, J.L.S.; SOUSA, E.M.O.; SILVA, H.N. et al. Hydrolate toxicity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its potential anaesthetic properties. **Aquaculture** 503, 367–372. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.058>
- MING, L. C.; FIGUEIREDO, R.O.; MACHADO, S. R. E. et al. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). **Acta Hort.** 426,555-559. 1996

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 247, (3170-3175) 1972. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999

NETTO, J. D. L.; OLIVEIRA, R. S.; & COPATTI, C. E. Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in sedation and anesthesia of juveniles of Nile tilapia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89, 2971-2974. 2017

OHARA, A. (2006). *Radicais livres: bons, maus e naturais*. Oficina de Textos.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, 95, (351-358). 1979 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

OLADEJI, O. S.; ADELOWO, F. E.; AYODELE, D. T. et al . Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, v. 6, p. e00137, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>

OLIVEIRA, C.P.B.; LEMOS, C.H.P.; FELIX E SILVA, A. et al. Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture** 513:734409. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734409>

OLIVEIRA, I. C.; OLIVEIRA, R. S. M.; LEMOS, C. H. D. P. et al. Essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Lippia sidoides* in the anesthetic induction and transport of ornamental fish *Pterophyllum scalare*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 48(3), 501-519. 2022

OMLIN, T.; & WEBER, J. M. Hypoxia stimulates the elimination of lactate in rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, 213(22), 3802-3809. 2010

PADUA, S.B.; DIAS, NETO J.; SAKABE, R. et al. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 48, 1171–74. 2013

PANKHURST, N.W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 265–275. 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>

PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.-Y. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**. 39, 877–884. 2008 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>

PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.D.; BECKER, A.G. et al. 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, (323-334). 2014.

- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry** 11, 1163–1182. 2012
- RIBEIRO, A. S.; BATISTA, E. D. S.; DAIRIKI, J. K. et al. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2016.
- RIBEIRO, P.A.P.; DE MELO HOYOS, D.C.; OLIVEIRA, C.G. et al. Eugenol and benzocaine as anesthetics for *Lophiosilurus alexandri* juvenile, a freshwater carnivorous catfish. **Aquaculture International** 27, 313–321. 2019 <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0326-3>
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- SACCOL, E.M.H.; TONI, C., PES, T.; OURIQUE, G.M. et al. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. And *Curcuma longa* L. Essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research** .48, 2012–2031, 2016
- SANTOS, A. C.; JUNIOR, G. B.; ZAGO, D. C. et al. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, 44(1), 106-113. 2017
- SENA, A. C.; TEIXEIRA, R.R.; FERREIRA, E. L. et al. 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. 2016
- SEVGILER, Y.; ORUÇ, E. Ö.; & ÜNER, N. Evaluation of the toxicity of etoxazole in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Biochemistry and physiology of pesticides**, 78(1), 1-8. 2004
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1 out. 1968.
- SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H. et al. Oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuroendocrinology Letters**, 30(1), 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** 218, 177–185. 2003 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00302-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00302-2)
- SOUZA, A.D.S.L.; PERET, A.C.; HAMOY, M. et al. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. **Aquaculture** 500, 160–169. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018>.
- SOUZA, C.; BALDISSERA, M. D.; BIANCHINI, A. E. 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 (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 44, 21-34, 2018
- SOUZA, G. M. P. R.; & MACHADO, B. H. Alterações no acoplamento simpático-respiratório

em ratos submetidos à hipóxia crônica interinamente. 2017

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: Anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research** 48:3383– 3392. 2017

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M, COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. **Boletim Instituto de Pesca** 44:17– 24. 2018 [https:// doi. org/ 10. 20950/ 1678- 2305. 2018. 263](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.263)

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N. 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**, 40, 701-714. 2014

VALKOVÁ, V.; ĎÚRANOVÁ, H.; GALOVIČOVÁ, L. et al. *Cymbopogon citratus* essential oil: Its application as an antimicrobial agent in food preservation. **Agronomy**, 12(1), 155. 2022

VANDER BOON, J.; VAN DEN THILLART, G. E.; & ADDINK, A. D. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 100(1), 47-53. 1991

VELISEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinaria Medicina**, v.50, n.6, p.269-275, 2005.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z.H. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture** 310, 369–375. 2011 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>.

VENTURA, A. S., JERÔNIMO, G. T., CORRÊA FILHO, R. A. C., DE SOUZA, A. I., STRINGHETTA, G. R., DA CRUZ, M. G., ... & POVH, J. A. *Ocimum basilicum* essential oil as an anesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum*: Hematological, biochemical, non-specific immune parameters and energy metabolism. **Aquaculture**, 533, 736124. 2021

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C.; DEKKERS, E. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research** 12: 399-402. 1978

WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; & SCOTT MCKINLEY, R. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture research**, 34(13), 1139-1146. 2003

YOUSEFI, M.; HOSEINI, S.M.; AYDIN, B. et al. Anesthetic efficacy and hematobiochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia *Oreochromis Niloticus*. **Aquaculture** 547:737540. 2022 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737540>

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

Artigo intitulado **ÓLEO ESSENCIAL *Cymbopogon citratus* COMO REDUTOR DE ESTRESSE EM TRANSPORTE SIMULADO DE JUVENIS DE TAMBAQUI**

Colossoma macropomum, que foi submetido na revista **Fishes** (Qualis capes para Zootecnia/ Recursos Pesqueiros)

4. ÓLEO ESSENCIAL *Cymbopogon citratus* COMO REDUTOR DE ESTRESSE EM TRANSPORTE SIMULADO DE JUVENIS DE TAMBAQUI *Collossoma macropomum*

Resumo: O estudo teve como objetivo avaliar o uso de óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (OECC) como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui (*Collossoma macropomum*) por 17 h. Foram utilizados 300 juvenis de tambaqui (10.06 ± 0.31 cm e 9.9 ± 0.38 g), os quais foram submetidos a um jejum de 24 h antes da simulação de transporte. Os juvenis foram colocados em sacos plásticos de 10 L (10 juvenis/L ou 20 juvenis/saco) e oxigênio puro, e submetidos as concentrações de OECC (8, 10 e 12 mg/L), além dos grupos controle água e controle álcool. A diluição do OECC foi com etanol (1:10). Amostras de água foram coletadas antes e após o transporte para verificação dos parâmetros físicos e químicos da água, além da amônia total, fluxo líquido dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , bem como verificada a sobrevivência dos peixes logo após o transporte e após 24 h. Após o transporte os animais foram eutanasiados e foram coletados fígado, músculo e brânquias para realização das análises bioquímicas e de estresse oxidativo. Não houve diferença significativa na sobrevivência em 0 e 24 h após o transporte ($p > 0.05$) entre os tratamentos. O emprego de OECC 8 mg/L no transporte reduziu a excreção de amônia e perda de íons de Cl^- e K^+ e apresentou menores níveis glicêmicos muscular, com 12 mg/L reduziu o lactato e triglicerídeos. Além disso, foi possível observar melhores condições antioxidantes com uso do OECC, constatados pelo aumento da atividade da enzima antioxidante SOD, em resposta ao aumento dos níveis de TBARS. O uso do OECC na concentração de 8 mg/L pode ser recomendado para juvenis de tambaqui para transportes de até 17 h, indicando ser um potencial redutor de estresse, decorrentes do transporte.

Palavras-chave: produtos naturais, sedativo, fluxo de íons, antioxidantes

4. ESSENTIAL OIL *Cymbopogon citratus* AS A STRESS REDUCER IN SIMULATED TRANSPORT OF TAMBAQUI *Colossoma macropomum* JUVENILES

Abstract: The study aimed to evaluate the use of *Cymbopogon citratus* essential oil (EOCC) as a sedative in simulated conditions of transport of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) for 17 h. 300 tambaqui juveniles (10.06 ± 0.31 cm and 9.9 ± 0.38 g) were used, which were fasted for 24 hours before transport simulation. The juveniles were placed in 10 L plastic bags (10 juveniles/L or 20 juveniles/bag) and pure oxygen, and subjected to EOCC concentrations (8, 10 and 12 mg/L), in addition to the water control and alcohol control groups. The EOCC was diluted with ethanol (1:10). Water samples were collected before and after transport to check the physical and chemical parameters of the water, in addition to total ammonia, net flux of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ ions, as well as checking the survival of the fish immediately after transport and after 24 H. After transport, the animals were euthanized and the liver, muscle and gills were collected for biochemical and oxidative stress analyses. There was no significant difference in survival at 0 and 24 h after transport ($p > 0.05$) between treatments. The use of EOCC 8 mg/L in transport reduced ammonia excretion and loss of Cl⁻ and K⁺ ions and presented lower muscle glycemic levels, with 12 mg/L reducing lactate and triglycerides. Furthermore, it was possible to observe better antioxidant conditions with the use of OECC, evidenced by the increase in the activity of the antioxidant enzyme SOD, in response to the increase in TBARS levels. The use of EOCC at a concentration of 8 mg/L can be recommended for tambaqui juveniles for transports of up to 17 hours, indicating that it has a potential to reduce stress resulting from transport.

Keywords: natural products, sedative, ion flow, antioxidants

4.1 INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie de peixe mais produzida na região amazônica, considerada rústica, apresenta rápido crescimento, boa conversão alimentar e carne saborosa, dentre outras características (VALLADÃO et al., 2018). Devido à grande importância econômica da espécie, a busca por alternativas que reduzam o estresse e melhore o bem-estar dos animais causado por práticas de rotina nas pisciculturas, é fundamental e crescente. Uma das práticas rotineiras é o transporte de peixes vivos, que pode produzir efeito estressor nos indivíduos transportados (VALLADÃO et al., 2016; SACCOL et al., 2018; VANDERZWALMEN et al., 2019; SILVA et al., 2020).

Nesse sentido, o uso de sedativo adicionado na água de transporte pode reduzir os efeitos deletérios sobre a saúde dos animais (HOHLENWERGER et al. 2016; AYDIN e BARBAS 2020). Sobretudo na região amazônica, onde o transporte desde as pisciculturas de reprodução até as de engorda pode ser de longa duração. Isto ocorre, devido a grande distância geográfica entre os municípios, sendo muita das vezes esse transporte obrigatoriamente fluvial. (JÚNIOR CARVALHO, et al., 2009).

Nos últimos anos, o uso de óleos essenciais extraídos de plantas foram investigados, como anestésicos para melhorar a condição do bem-estar dos peixes em vários processos de manipulação, incluindo o transporte (BRANDÃO et al., 2021; MIRZARGAR et al., 2022). Um deles é o OECC, planta nativa de regiões tropicais do continente asiático, especialmente da Índia, pertencente a família Poaceae (OLADEJI et al., 2019). Outros autores já avaliaram o efeito anestésico e sedativo do óleo essencial de *C. citratus*, em peixes ornamentais como acará bandeira *Pterophyllum scalare* (OLIVEIRA et al., 2022), electric blue hap (*Sciaenochromis fryeri*) e labido yellow (*Labidochromis caeruleus*) (KIZAK et al., 2018). Seus compostos ativos têm se destacado por suas propriedades farmacológicas, apresentando ações anticonvulsivante, antinociceptiva, antibacteriana e anestésicas (BASTOS et al., 2010; DE MENEZES-FILHO et al., 2014; LOPEZ- ROMERO et al., 2015), ansiolítica (HACKE et al. 2020), além da rápida recuperação da função cardíaca pós anestesia em peixes (ARAÚJO et al., 2023).

Quando em concentrações menores, os anestésicos têm efeito sedativo de forma eficaz em manejos de longa duração (TEIXEIRA et al., 2018). Ocasionalmente pela desaceleração do metabolismo dos peixes, resultando em menor consumo de oxigênio e excreção de amônia, consequentemente preservando a qualidade da água durante o transporte, garantindo o bem-estar animal (BUCKING, 2017).

O transporte pode desencadear alterações fisiológicas como perda de íons, aumento do

fluxo sanguíneo e aumento do consumo de oxigênio (ELLIS et al., 2012) o que pode aumentar a formação de radicais livres espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (BARBAS et al., 2017). Em resposta, os organismos podem ativar o sistema antioxidante e produzir enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), além de antioxidantes não enzimáticos como glutathiona reduzida (GSH), o qual é rapidamente oxidado em situações nas quais ocorre aumento na produção celular de EROs (OHARA, 2006; CHOWDHURY e SAIKIA, 2020).

Deste modo, considerando a importância de investigar substâncias sedativas que reduzam o estresse no transporte de peixes na Amazônia, apresentamos este estudo como o primeiro a investigar os efeitos do OECC como sedativo em tambaqui. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi testar os efeitos de diferentes concentrações do OECC em transporte simulado de juvenis tambaqui, avaliando parâmetros qualidade da água, bioquímicos e de estresse oxidativo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do óleo essencial *Cymbopogon citratus* e composição química

A parte aérea da planta *Cymbopogon citratus* foi coletada em Belterra, no estado do Pará, norte do Brasil, e o óleo essencial foi extraído no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (LABBEX-UFOPA) Santarém Pará. A extração e caracterização química do OECC foram feitas conforme descrito em detalhes por (PEREIRA et al. 2020).

4.2.3 Peixes

Trezentos juvenis de tambaqui (11.05 ± 0.44 cm e 10.9 ± 0.52 g) foram obtidos de Piscicultura Comercial em Santarém, PA, Brasil. A aclimação foi realizada em tanques de 1000 L (15 dias) em sistema de recirculação com aeração constante. Durante este período os animais foram alimentados com ração comercial onívora (Presence® Nutripiscis) com 32% de proteína bruta e $3.500 \text{ kcal kg}^{-1}$ de energia bruta, três vezes ao dia até a saciedade aparente. Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água diariamente (temperatura $26,1 \pm 0,1$

°C, pH $7,71 \pm 0,06$, oxigênio dissolvido $5,40 \pm 0,10$ mg/L, e condutividade elétrica $419,00 \pm 11,05$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}$), com jejum 24h antes do início dos experimentos.

Esta pesquisa foi realizada com a aprovação de seu protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará sob o número de registro 1120210126.

4.2.4 Procedimento Experimental

Para a realização do experimento simulou-se um transporte de juvenis de tambaqui com duração de 17 h, condição de longa duração usual para um transporte fluvial de barco do município de Santarém ($2^\circ 27' 16,45''$ S, $54^\circ 41' 57,33''$ W) até o município de Oriximiná ($01^\circ 45' 42,59''$ S, $55^\circ 51' 49,74''$ W), ambos no estado do Pará, Brasil. Os juvenis foram colocados em sacos plásticos de 10 L, contendo 2 L de água (10 juvenis/L ou 20 juvenis/saco) e adicionado oxigênio puro. Foram testadas três concentrações do OECC (8, 10 e 12 mg/L) adicionadas na água de transporte, o que corresponde a 10% das concentrações que induziram anestesia profunda em menor tempo no tambaqui. Além disso, também foram utilizados mais dois tratamentos (água e água + 117,3 μL etanol/L), todos em triplicata. O OECC foi diluído em etanol (1:10). Após acondicionados os animais nos diferentes tratamentos, os sacos foram fechados com tiras de borracha e colocados individualmente em aquários de vidro vazios. O procedimento de simulação foi conforme descrito por SILVA et al., (2017). Imediatamente após o transporte, amostras de músculo, brânquias e fígado foram coletadas de nove animais (N = 3 de cada saco de transporte) de cada tratamento. Os demais animais de cada repetição foram colocados em aquários plásticos (7 L) para avaliação de recuperação, contendo água limpa (sem anestésico) e aeração constante. Eles permaneceram nestas condições por 24 h para avaliar a mortalidade após o transporte, de acordo com protocolo de BECKER et al., (2012).

4.2.5 Análise de água e fluxo líquido de íons

A água foi coletada antes e após o transporte para determinação de parâmetros físicos e químicos. Temperatura, níveis de oxigênio dissolvido, condutividade e pH foram medidos usando equipamento portátil multiparâmetro AKSO88, dureza da água pelo método titulante com EDTA e alcalinidade conforme (BOYD e TUCKER 1992). O dióxido de carbono segundo

Summerfelt et al. (2000). A amônia total foi determinada pelo método do salicilato de hipoclorito conforme descrito por (VERDOUW et al., 1978) e a amônia não ionizada foi calculada acordo com (COLT e TOMASSO 2002).

Os níveis de Cl^- na água foram determinados conforme descrito por (ZALL et al., 1956) e os níveis de Na^+ e K^+ foram determinados com um fotômetro de chama (Benfer Mark, modelo LB-BFC300). Fluxos líquidos de íons foram calculados de acordo com (GONZALEZ et al., 1998).

4.2.6 Parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo

Para avaliar os níveis de metabólitos, os tecidos (fígado, músculo e brânquias) foram fragmentados individualmente em uma placa de Petri gelada e posteriormente homogeneizado com Ultra-Turrax®, T25basic com uma ferramenta de dispersão S25N-8G, IKA®-Werke, com 7,5 vol. (p/v) de ácido perclórico 0,6 N gelado e neutralizado com o mesmo volume de 1 M KHCO_3 . Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados (30 min, 4000 x g, 4 °C), e os sobrenadantes foram recuperados em alíquotas e armazenados a -20 °C. Os parâmetros bioquímicos (glicose, lactato, proteína total e triglicerídeos) foram determinados com kit comercial Labtest® (Belo Horizonte -MG Brasil) (Glicose PAP Liquiform Ref. 84; Lactato Enzimático Ref. 138; Proteínas Totais Ref. 99; Triglicerídeos Liquiform Ref. 87) com adaptações para leitura em microplacas de 96 poços. A amônia tecidual foi determinada pelo método do salicilato-hipoclorito, de acordo com (VERDOUW et al., 1978). Todos os ensaios foram executados na Microplate Reader (Diatek DR-200B, DiaTek Instruments) usando o software KCjunior™.

A outra porção das amostras de tecidos foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio 0,3 M + KCl 140 mM pH 7,4 na proporção de 1:10 para análise do estresse oxidativo. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram estimados de acordo com o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo (OHKAWA et al. 1979) adaptado por Baldissera et al. (2016), sendo os resultados expressos em nmol de MDA g tecido. O ensaio da atividade da SOD foi baseado pela inibição da oxidação do pirogalol pela SOD conforme descrito por (MISRA e FRIDOVICH 1972) e expressa como Unidade de SOD/ mg proteína. Os níveis de GSH foram determinados de acordo com (SEDLAKE e LINDSAY 1968) pela reação de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e cisteína como curva padrão e valores foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

4.2.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro Wilk para normalidade e de Levene para homocedasticidade. Foi realizada análise de variância (ANOVA) One way. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$) e teste de Dunnet para comparar simultaneamente a média de tratamentos com óleo essencial com a média do grupo controle água por meio do software Sigma Plot v.11.

4.3 Resultados

Não houve mortalidade dos peixes ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre os valores antes e após o transporte para oxigênio dissolvido, dióxido de carbono, pH, condutividade, amônia total e amônia não ionizada, no entanto para temperatura e dureza da água não houve diferença antes e depois do transporte (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água antes e depois do transporte simulado, em sacos plásticos (17 h) de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em sacos plásticos com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) adicionado na água.

Parâmetros da água	Antes do transporte	Depois do transporte (17h)				
		Controle água	Controle álcool	OECC 8mg/L	OECC 10mg/L	OECC 12mg/L
Oxigênio dissolvido	5,50±0,00	9,83±0,95 ^{a*}	7,90±1,10 ^{a*}	8,50±0,70 ^{a*}	7,86±0,65 ^{a*}	10,60±0,70 ^{a*}
Dióxido de carbono	0,94±0,00	63,80±1,46 ^{a*}	60,01±4,01 ^{a*}	48,19±3,67 ^{b*}	64,72±3,42 ^{a*}	51,05±5,22 ^{b*}
Temperatura	25,90±0,00	25,66±0,05 ^a	25,73±0,05 ^a	26,06±0,15 ^a	26,16±0,05 ^a	26,26±0,05 ^a
pH	7,63±0,00	6,18±0,02 ^{a*}	6,15±0,05 ^{a*}	6,18±0,02 ^{a*}	6,13±0,08 ^{a*}	6,16±0,01 ^{a*}
Condutividade	420,00±0,00	672,66±10,50 ^{a*}	666,66±9,07 ^{a*}	622,00±2,00 ^{b*}	655,66±11,67 ^{a*}	625,00±8,00 ^{b*}
Alcalinidade	20,26±0,00	47,29±1,01 ^{a*}	42,78±2,25 ^{a*}	36,78±1,30 ^{b*}	43,53±3,44 ^{a*}	38,28±3,90 ^{b*}
Dureza	58,37±0,00	58,63±2,30 ^a	57,30±2,30 ^a	57,30±1,15 ^a	56,30±1,15 ^a	56,63±2,30 ^a
Amônia Total	1,38±0,00	15,89±0,84 ^{a*}	12,72±2,00 ^{b*}	11,20±0,13 ^{b*}	14,17±1,48 ^{a*}	12,19±1,05 ^{b*}
Amônia não ionizada	0,03±0,00	0,01±0,00 ^{b*}	0,009±0,00 ^{b*}	0,009±0,00 ^{b*}	0,01±0,00 ^{b*}	0,01±0,00 ^{b*}

Valores estão expressos em médias \pm desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas quando comparados com valores antes do transporte ($P < 0,05$) teste de Dunnet. Letras diferentes, nas linhas, indicam diferenças entre os tratamentos após o transporte ($P < 0,05$). ANOVA $p < 0,05$ teste de tukey. Oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e amônia total estão expressos em (mg/L). Amônia n-ionizada μ mol/L, condutividade elétrica (μ S.cm), alcalinidade, dureza (mg CaCO_3 /L) e temperatura em $^{\circ}\text{C}$.

Não houve efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos após o transporte para oxigênio dissolvido, pH e amônia não ionizada. Entretanto, os níveis de CO_2 reduziram significativamente em peixes transportados com adição de 8 e 12 mg/L de OECC comparado ao grupo controle (somente água). Também, os valores de condutividade elétrica, alcalinidade e amônia total foram menores significativamente com uso de OECC 8 e 12 mg/L comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Houve menor perda de íons de Cl^- em peixes transportados na concentração de 8 mg/L de OECC, comparado ao grupo controle. No fluxo iônico de potássio o uso de OECC e CALc reduziu a perda de íons comparado ao grupo controle. Em sódio houve influxo de íons em todos os tratamentos, com maior absorção na concentração de OECC 10 mg/L comparado ao controle (Fig 1).

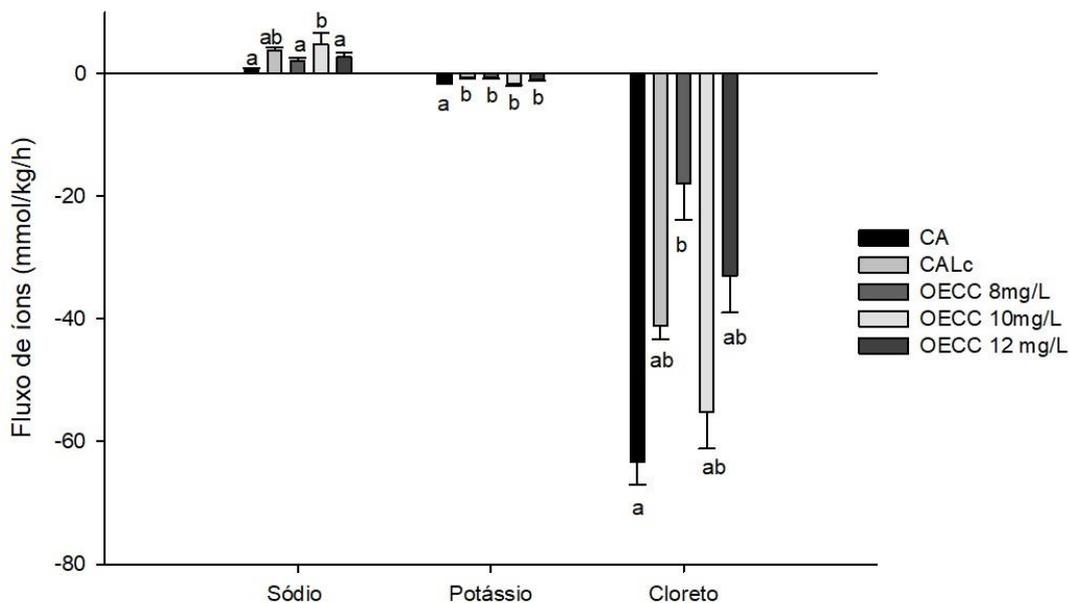


Figura 1. Fluxo iônico de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-), após o transporte simulado de 17h, com controle água (C.A), controle álcool (CALc) e concentrações de OECC em 8, 10, e 12 mg/L. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. ANOVA ONE WAY, $p < 0,05$ teste tukey.

Nos parâmetros bioquímicos, os níveis de lactato hepático foram significativamente menores com uso do OECC na concentração 12 mg/L comparado aos outros tratamentos ($p < 0,05$). Maiores valores de amônia hepática foram encontrados em peixes transportados com uso de 10 e 12 mg/L de OECC comparado aos outros tratamentos. Não foram observadas diferenças

significativa nos níveis de glicose e triglicerídeos hepáticos entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Metabólitos em tecidos de tambaqui, *Colossoma macropomum*, após o transporte simulado (17 h) com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC) adicionado na água.

Tecido	Tratamentos				
Metabólitos	Controle Água	Controle Álcool	OECC 8 mg/L	OECC 10 mg/L	OECC 12mg/L
Fígado					
Glicose	219,24±50,98 ^a	274,14±41,95 ^a	279,40±47,56 ^a	200,78± 43,83 ^a	171,93±41,01 ^a
Lactato	3,80±1,05 ^a	3,23±1,14 ^a	3,21±1,43 ^a	4,70±1,51 ^a	0,39±0,12 ^{b*}
Triglicerídeos	14,54±3,70 ^a	17,18±5,78 ^a	22,39±8,46 ^a	20,04±7,30 ^a	18,20±5,42 ^a
Proteína	11,75±0,94 ^a	11,09±2,08 ^a	11,23±0,80 ^a	11,67±2,23 ^a	11,04±1,07 ^a
Amônia	268,25±72,88 ^c	371,47±25,37 ^{cb}	238,46±82,99 ^c	697,41±10,77 ^{a*}	481,33±30,24 ^{b*}
Tecidual					
Músculo					
Glicose	4,71±1,56 ^a	5,79±1,17 ^a	2,49±0,92 ^{b*}	4,69±1,12 ^a	4,44±0,68 ^a
Lactato	16,59±3,70 ^a	17,14±3,58 ^a	13,85±5,06 ^a	24,24±7,94 ^a	4,82±1,52 ^{b*}
Triglicerídeos	9,79±2,73 ^a	11,44±4,79 ^a	13,66±6,83 ^a	9,95±4,55 ^a	4,72±1,50 ^{b*}
Proteína	8,02±1,84 ^a	8,48±1,48 ^a	9,06±3,19 ^a	9,03±2,36 ^a	6,29±2,01 ^a
Amônia	170,51±52,17 ^a	227,36±98,91 ^a	317,34±83,34 ^a	185,52±31,21 ^a	67,64±20,67 ^{b*}
Tecidual					
Brânquias					
Glicose	11,05±3,83 ^a	13,40±3,14 ^a	17,44±2,25 ^a	14,03±4,15 ^a	15,84±4,00 ^a
Triglicerídeos	14,62±3,11 ^a	9,97±0,83 ^{b*}	19,11±7,00 ^a	18,13±4,88 ^a	25,79±6,02 ^a
Proteína	8,72±1,63 ^a	9,28±2,64 ^a	11,63±2,66 ^a	11,87±3,08 ^a	10,00±1,23 ^a
Amônia	1316,22±235,61 ^a	1122,49±221,64 ^a	1280,02±400,41 ^a	847,68±106,29 ^{b*}	1448,08±165,41 ^a
Tecidual					

Valores estão expressos em médias ± desvio padrão. Letras minúsculas apresentam diferenças significativas na mesma linha entre diferentes tratamentos; * indica diferença significativa com o grupo controle. ANOVA one-way $p < 0.05$ teste de Dunnett. Glicose, lactato e triglicerídeos, são expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Amônia tecidual é expressa em $\mu\text{M/g}$ de tecido e proteína mg de proteína/g de tecido.

Dos metabólitos analisados no músculo, houve menores níveis de glicose ($p < 0,05$) com uso de 8mg/L de OECC comparado aos demais tratamentos. Peixes transportados com 12 mg/L de OECC apresentaram menores níveis de lactato, triglicerídeos e amônia muscular ao final do transporte, comparado aos demais tratamentos (Tabela 2). Para os metabólitos analisados nas brânquias, não foram observadas diferença nos níveis de glicose entre os tratamentos. Os níveis de triglicerídeos foram menores significativamente no controle álcool ($p < 0.05$). Os níveis de amônia branquial foram menores significativamente no tratamento com 10mg/L de OECC $p < 0.05$. Os níveis de proteínas totais não foram afetados pelo transporte ou tratamentos nos tecidos avaliados (Tabela 2).

Houve maiores níveis de TBARS hepático em peixes transportados com 10mg/L de OECC (Fig 2A), no entanto quando transportados na concentração de 8 mg/L e 10 mg/L de

OECC estimulou a atividade hepática de SOD (Fig 2B). Os níveis hepáticos de GSH não foram afetados pelo transporte ou tratamentos (Fig. 2C) ($P > 0,05$)

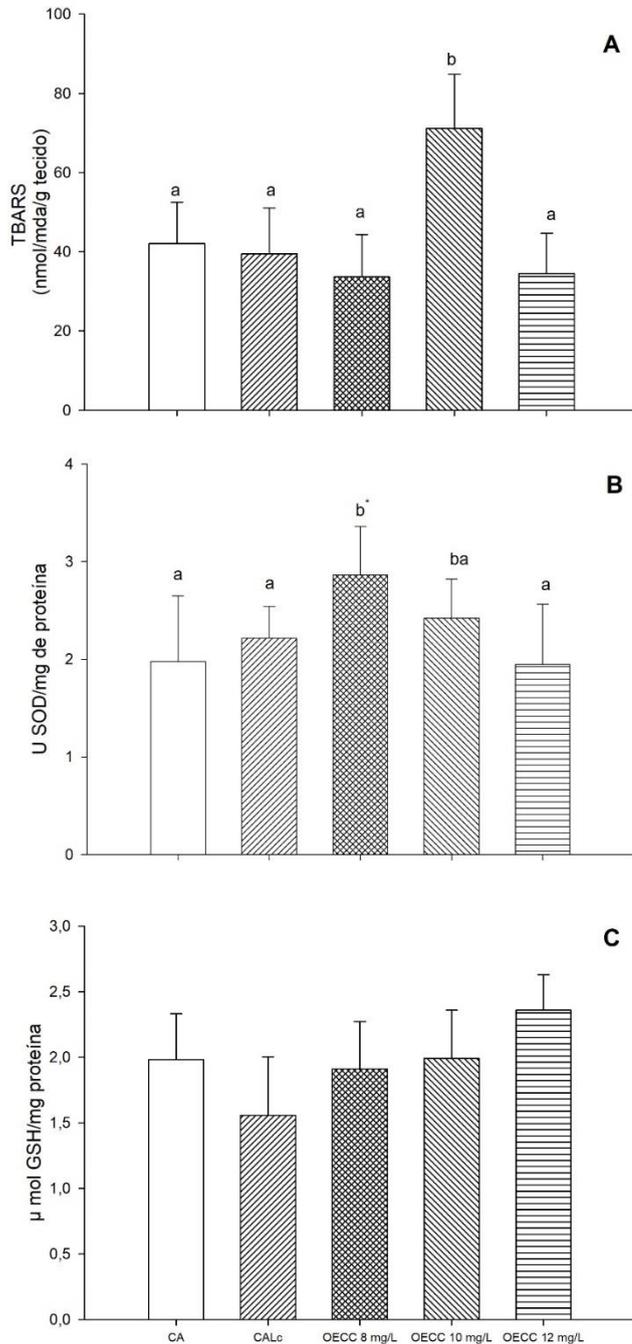


Figura 2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (A), atividade da superóxido dismutase SOD (B) e níveis de glutatona reduzida GSH (C) no fígado de tabaqui após o transporte simulado de 17h, com controle água (C.A), controle álcool (CALc) e concentrações de OECC em 8, 10, e 12 mg/L. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. *indica diferença significativa com o grupo controle. ANOVA ONE WAY, $p < 0,05$ teste tukey.

Menores níveis de TBARS no músculo foram observados em peixes transportados com 8mg/L de OECC (Fig 3A). Peixes transportados com 12 mg/L de OECC tiveram maior atividade de SOD e GSH muscular que os demais tratamentos. (Fig 3 B e C)

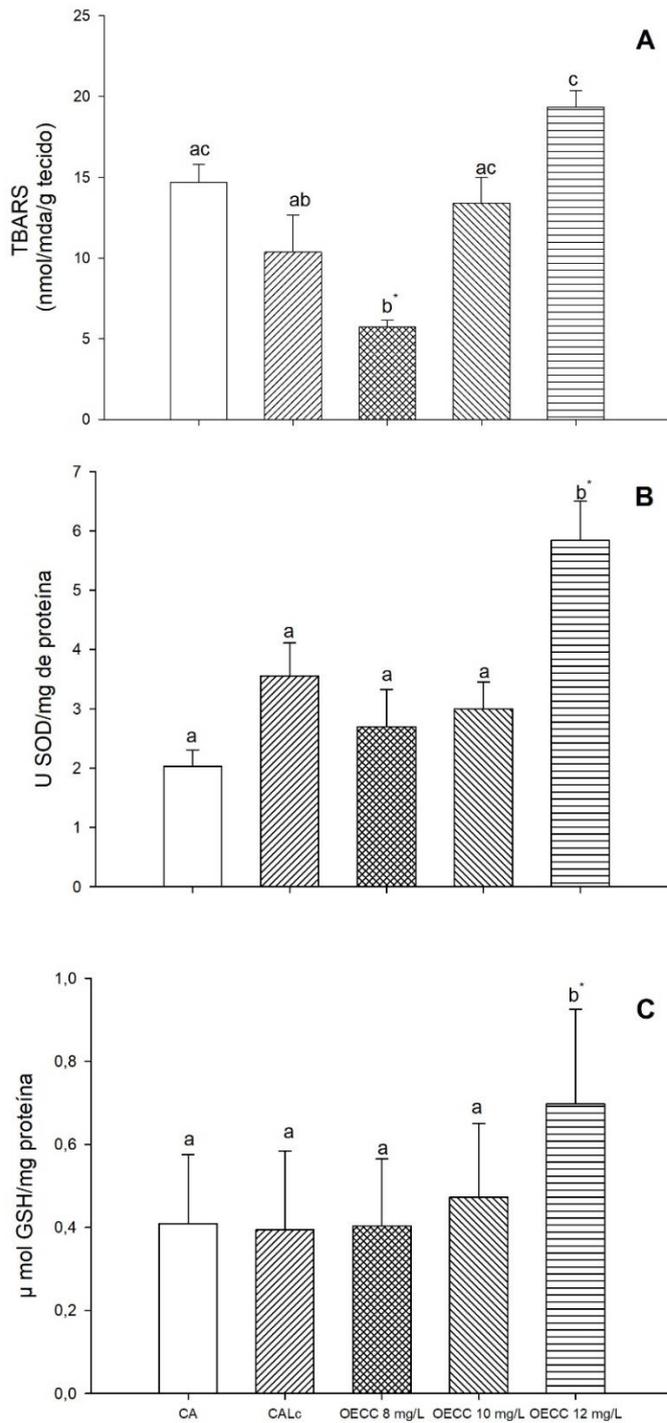


Figura 3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (A), atividade da superóxido dismutase SOD (B) e níveis de glutaciona reduzida GSH (C) no músculo de tambaqui após o transporte simulado

de 17h, com controle água (C.A), controle álcool (CALc) e concentrações de OECC em 8, 10, e 12 mg/L. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.*indica diferença significativa com o grupo controle. ANOVA ONE WAY, $p < 0,05$ teste tukey.

Os níveis de TBARS nas brânquias foi maior em peixes transportados com 12 mg/L (Fig 4A), no entanto a atividade de SOD nas brânquias não foi afetada pelo transporte ou tratamentos. (Fig. 4B) ($P > 0,05$). A atividade branquial de GSH foi menor em 10 mg/L OECC ($P < 0,05$) do que o grupo controle e demais tratamentos. (Fig. 4C)

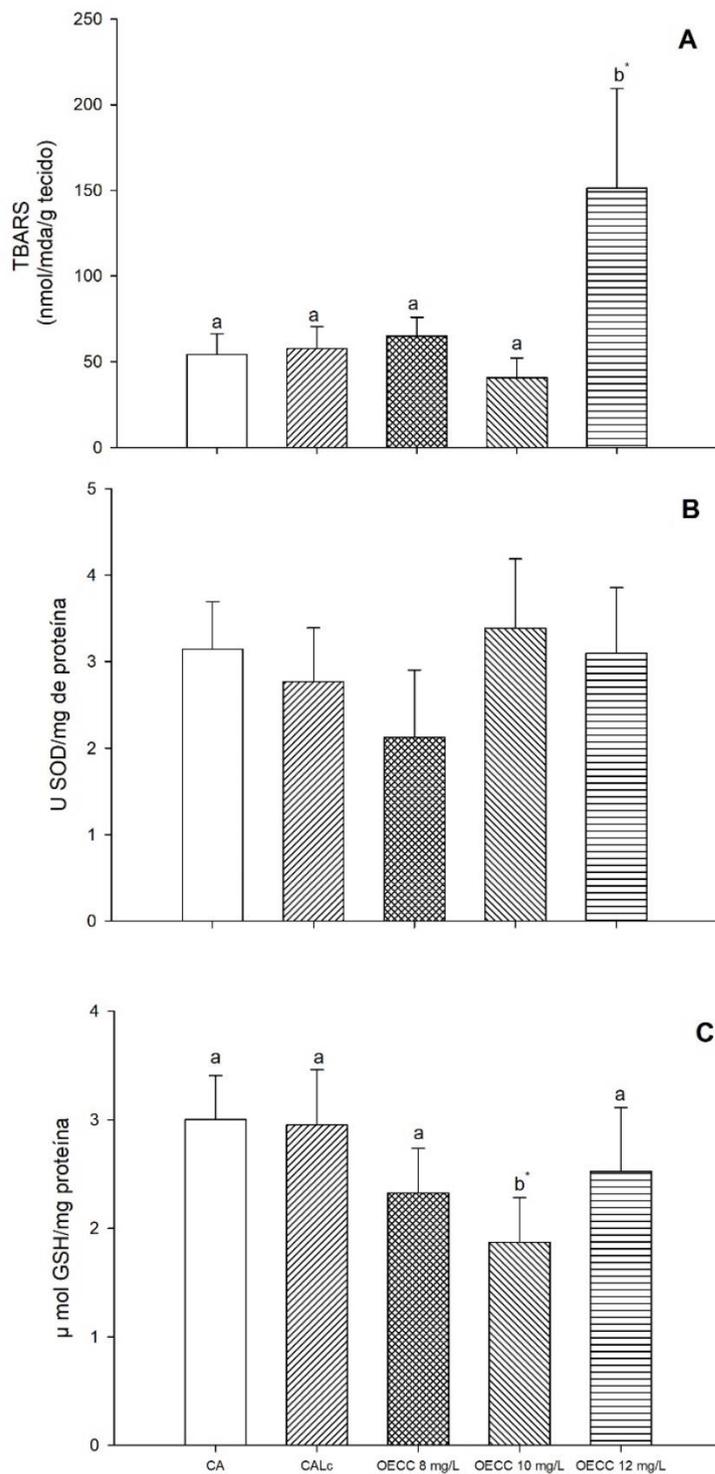


Figura 4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS (A), atividade da superóxido dismutase SOD (B) e níveis de glutatona reduzida GSH (C) nas brânquias de tambaqui após o transporte simulado de 17h, com controle água (C.A), controle álcool (CALc) e concentrações de OECC em 8, 10, e 12 mg/L. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.*indica diferença significativa com o grupo controle. ANOVA ONE WAY, $p < 0,05$ teste tukey.

4.4 Discussão

Após o transporte de tambaqui por 17 h, foram registrados altos níveis de oxigênio dissolvido na água. Quando se adiciona oxigênio puro no saco ocorre supersaturação do oxigênio dissolvido, causada pela pressão interna do saco (MAZANDARANI et al., 2017), isso esclarece os elevados níveis de oxigênio dissolvido observados no presente estudo, corroborando com resultados reportados por (OLIVEIRA et al., 2022) no transporte de *Pterophyllum scalare*. O aumento de CO₂, e redução do pH neste estudo corroborou com o estudo de (SILVA et al., 2017) no transporte com o hidrolato de *L. alba* e (COSTA et al. 2021) com hidrolato de *Myrcia silvatica*, ambos simularam o transporte de juvenis de tambaqui por 17h.

A respiração aumenta a formação de ácido carbônico pelos peixes e reduz o pH na água de transporte (BALDISSEROTTO et al., 2008; SALBEGO et al. 2015), o que justifica a diminuição de pH apresentado no presente estudo, no entanto não interfere no crescimento ou sobrevivência do tambaqui, pois indivíduos dessa espécie toleram pH 4,0 sem mudanças no seu desenvolvimento (ARIDE et al., 2007), constatados pela ausência de mortalidade durante e após 24h de transporte. Com uso de OE de *O. gratissimum* (0, 5 e 10 mg L⁻¹) em *L. alexandri*, (BOAVENTURA et al., 2021) também não observaram mortalidade durante e após 24 h de transporte em sacos plásticos. Os valores de alguns parâmetros da água estão dentro da faixa apropriada para a criação de peixes de água doce, que geralmente variam de pH de 6,0 a 9,0 e temperatura de 26°C a 29°C, bem como níveis de alcalinidade e dureza variando de 20 a 300 mg.L⁻¹ e 0 a 75 (mg.L⁻¹) CaCO₃, respectivamente (ARANA 2010; FARIA et al. 2013; LEIRA et al. 2017). Os níveis mais elevados da alcalinidade pós transporte pode ser explicado pela regurgitação de alimento consumido (ração comercial que contém calcário calcítico), indicando tempo insuficiente na depuração dos peixes. Resultados similares foram encontrados por (GOLOMBIESKI et al., 2003; BECKER et al., 2012; 2013; 2016).

Os efluxos líquidos de K⁺ foram reduzidos em peixes transportados nos tratamentos com controle álcool (CALc), 8, 10 e 12 mg/L de OECC, assim como menor efluxo de Cl⁻ com uso de OECC 8mg/L. Esses resultados, somados aos menores valores de alcalinidade em 8 e 12 mg/L de OECC, pode ter contribuído para a redução da condutividade elétrica na água de transporte, sugerindo menor perda de íons. Similarmente ao presente estudo, o uso do OE de *Aloysia triphylla* (quimiotipo citral 72%) no transporte de juvenis de *Rhamdia quelen*, reduziu o efluxo de íons (PARODI et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2014), resultados semelhantes com *L. alba* (quimiotipo citral) BECKER et al., (2013) e em tambaqui com hidrolato (SILVA

et al., 2017; COSTA et al., 2021). O influxo de Na^+ ocorreu em todos os tratamentos, isso pode estar ligado a ação do cortisol, que estimula a diferenciação de células branquiais para a captação de íons, entre eles o Na^+ para a corrente sanguínea.

O aumento na amônia (ionizada e não ionizada) são esperados durante o transporte de peixes (SENA et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2017; MAZANDARANI et al., 2017) corroborando com o presente estudo onde houve aumento nos níveis de amônia total ao final do transporte, porém com menor excreção na concentração de 8mg/L de OECC comparado ao grupo controle, isso indica uma redução do metabolismo de nitrogênio dos peixes. Resultados similares com redução dos níveis de amônia foram relatados no transporte de tambacu e tilápia do Nilo com óleo essencial de *L. alba* por (SENA et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2017; MIRZARGAR et al., 2022) e *Pterophyllum scalare* com eugenol (OLIVEIRA et al., 2019) adicionados à água. Os níveis de amônia não ionizada ao final do transporte em todos os tratamentos foram significativamente menores que os iniciais (antes do transporte), devido à redução do pH da água, como resultado, a toxicidade da fração não ionizada foi muito baixa para o tambaqui (BOYD, 1982).

Em condições estressantes, como o transporte, há a produção de catecolaminas e cortisol, que aumenta o fluxo sanguíneo, transporte de oxigênio e a permeabilidade do tecido branquial, com isso aumentam a demanda de energia para responder a ação do estresse (McDONALD e MILLIGAN, 1997) e reservas energéticas são mobilizadas como resposta adaptativa ao estresse (IVERSEN et al., 2005; IVERSEN et al., 2009). Em razão dessa mobilização, o aumento dos níveis glicêmicos tem sido utilizado como um indicador de estresse em peixes (VELISEK et al., 2011; PANKHURST 2011). Os juvenis de tambaqui transportados com OECC apresentaram níveis hepáticos de glicose similares, no entanto observou-se baixos níveis de lactato hepático com 12 mg/L de OECC, indicando que o metabolismo aeróbico foi a principal fonte de energia necessária durante o transporte, e que o uso do OECC não estimulou a hiperglicemia. Resultados similares foram relatados por (ZEPPEFELD et al., 2014) que encontrou redução dos níveis de lactato no fígado com uso de óleo essencial *A. triphylla* no transporte de jundiás.

Os peixes transportados com uso de 10 e 12 mg/L apresentaram maiores níveis de amônia hepática. Altos níveis de amônia estão associados à atividade das enzimas transaminases (INOUE et al., 2011 ; GRESSLER et al., 2015) envolvidos na mobilização de aminoácidos via gliconeogênese para a produção de glicose (CHATTERJEE et al., 2006). No entanto não é possível constatar que houve catabolismo de proteínas para suprir a demanda de energia glicosídica do estresse, haja vista que nesse estudo não houve alterações nos níveis de

proteína total em nenhum dos tecidos avaliados. A produção de albumina pode ser influenciada pelas condições do fígado e pelas alterações do estresse (McDONALD e MILLIGAN, 1992) que também influenciam alterações na frequência ventilatória e fluxo de sangue pelas brânquias, dificultando a excreção de composto nitrogenados (RIBEIRO et al., 2016; HOHLENWERGER et al., 2017), isso pode explicar o acúmulo de amônia nos tecidos hepáticos, e o níveis baixos nas brânquias com uso de 10 mg/L de OECC.

No músculo, o uso de 8mg/L do OECC reduziu os níveis de glicose, e em 12 mg/L observou-se menores níveis de triglicerídeos e lactato, associados a menores níveis de amônia muscular. Isso indica que o catabolismo desse metabólito (triglicerídeos) e metabolismo anaeróbico (lactato) podem ter sido preservados (VELISEK et al., 2005), e o metabolismo de carboidratos foi suficiente para suprir a demanda aumentada de energia durante o transporte.

Em condições normais (homeostase), o organismo mantém um equilíbrio entre agentes oxidantes e pró-oxidantes (POLI et al., 2012). No entanto, situações de estresse como transporte, e condições hiperóxicas (BARBAS et al., 2017), podem causar desequilíbrio na célula, aumentando a produção de EROs.

Neste estudo avaliou-se as atividades de agentes antioxidantes como a SOD, que é uma importante enzima responsável pela eliminação das EROS produzidas nas células (CHEESEMAN e SLATER, 1994). Essa enzima transforma o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água (H_2O). A GSH é o mais abundante antioxidante, é rapidamente oxidado em situações nas quais ocorre aumento na produção celular de EROs. (OHARA, 2006). A presença de altas concentrações de EROs nas células pode causar diversos tipos de danos teciduais, como a oxidação de lipídios TBARS (STADTMAN e LEVINE, 2003 SEVGILER et al., 2004). Neste estudo, foram observados maiores níveis de TBARS em peixes transportados com 10 mg/L de OECC no fígado, 12 mg/L no músculo e 12 mg/L nas brânquias. No entanto, os efeitos da peroxidação das substâncias (formação de EROS) podem estimular a produção de substâncias antioxidantes (AHMAD et al., 2000), como a SOD que aumentou a sua atividade antioxidante com uso de 8 mg/L de OECC no fígado e no músculo com 12mg/L de OECC, associada a aumento da atividade de GSH muscular, esse aumento da atividade antioxidante possivelmente contribuiu para prevenir a oxidação lipídica no tecido muscular. Resultados similares foram reportados em juvenis de *Rhamdia quelen* por (BRAUN et al., 2008) que observaram elevação dos níveis de TBARS no fígado e músculo, que estimulou a maior atividade SOD nos mesmos tecidos.

As brânquias estão em contato direto com o meio ambiente e, portanto, são o principal alvo de substâncias presentes na água (BRANDÃO et al. 2021). (BALDISSERA et al., 2019)

investigaram alterações no metabolismo energético nas brânquias de *L. alexandri* submetido ao estresse e observaram maiores danos celulares causados por EROs, isso explica os níveis mais elevados de TBARS em peixes transportados com 12mg/L nas brânquias.

No presente estudo, houve redução dos níveis de peroxidação lipídica no músculo de peixes transportados com 8mg/L de OECC, outros autores relataram resultados similares como menores níveis de TBARS no músculo de jundiás transportados com OE de *A. triphylla* (ZEPPEFELD et al., 2014) e com óleo essencial de *L. alba* (AZAMBUJA et al., 2011).

4.5 Conclusão

Portanto, recomenda-se o uso de 8 mg/L de OECC como sedativo no transporte de juvenis de tambaqui, uma vez que reduziu a excreção de amônia, perda de íons de Cl^- e K^+ e apresentou menores níveis glicêmicos no músculo. Além disso, foi possível observar melhores condições antioxidantes com uso do OECC, constatados pelo aumento da atividade da SOD, em resposta ao aumento da lipoperoxidação, melhorando o status oxidativo dos peixes.

4.6 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo INCT-ADAPTA 2 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPQ/Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas - FAPEAM).

4.7 Referências Bibliográficas

AHMAD, I.; TANG, L.; & PHAM, H. Identification of neural progenitors in the eye of adult mammals. **Biochemical and Biophysical Research Papers**, 270(2), 517-521. 2000

ARANA, V.L. *Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas*. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis. 62pp. 2010

ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; & VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, 38(6), 588-594. 2007

ARAÚJO, E. R. L.; TORRES, M. F.; HAMOY, M. et al. Cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* anaesthetised with geraniol and citronellol. **Aquaculture**, 565, 739101, 2023

AYDIN, B. Anaesthetic efficacy of eugenol in doctor fish (*Garra rufa*): Behavioural and cardiovascular responses. **Aquaculture Research**. 2020. <https://doi.org/10.1111/are.15049>

AZAMBUJA, C.R.; MATTIAZZI, J.; RIFFEL, A.P.K. et al . Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, 319, (156-161). 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>

BASTOS, J.F.; MOREIRA, I.J.; RIBEIRO, T.P. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 106, 331–337. 2010 <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x>

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BALDISSEROTTO, B. et al. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 501, 224-229. 2019

BALDISSEROTTO, B. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil: 3a edição revista, atualizada e ampliada**. Santa Maria:editoraufsm, 2020.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2. Ed. Santa Maria: Ed da UFSM, 2009.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. Santa Maria: editora ufsm, 2013. 352 Pp.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E.; GOMES, L.C. et al. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 405-412, 2008 <https://doi.org/10.1007/s10695-0089200-y>.

BALDISSERA, M.D.; GONÇALVES, R.A.; SAGRILLO, M.R. et al. Effects of treatment with the anti-parasitic drug diminazene aceturate on antioxidant enzymes in rat liver and kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 389, (429-438). 2016 10.1007/s00210-016-1212-z

BARBAS, L.A.L.; HAMOY, M.; MELLO, V.J. et al. Essential oil of *citronella modulates* electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: a new anaesthetic for use in fish. **Aquaculture**. 479:60-68. 2017

BECKER, A.G.; CUNHA, M.A.D.; GARCIA, L.D.O. et al. Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**. v. 11, p. 675-681, 2013.

- BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 38,(789-796). 2012 10.1007/s10695-011-9562-4
- BECKER, A.G.; PARODI, T. V., ZEPPENFELD, C. C. 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**, p.1-9, 2016
- BRANDÃO, R.B.; SOUZA, D.C.M.; SEBASTIÃO, F.A. et al. Essential oils as anaesthetics and sedatives in native Brazilian fish, with a special emphasis on *Colossoma macropomum*: a review. **Aquaculture Research** 1, 1–14. 2021
- BOAVENTURA, T. P.; SOUZA, C. F.; FERREIRA, A. L. et al. The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil during the transport of *Lophiosilurus alexandri*: Water quality, hematology, blood biochemistry and oxidative stress. **Aquaculture**, 531, 735964. 2021
- BOYD, C. E. *Gestão da qualidade da água para piscicultura em lagoas*. Elsevier Editora Científica, 1982.
- BOYD, C. E.; AND C. S. TUCKER. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama: Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1992
- BRAUN, N.; DE LIMA, R. L.; DALLA FLORA, F. et al. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Ciência Animal Brasileira**. 2008
- BUCKING, C.. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology** 187, 1–18. 2017 <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1026-9>
- CHATTERJEE, N.; PAL, A.K.; DAS, T. et al. Secondary stress responses in Indian major carps *Labeo rohita* (Hamilton), *Catla catla* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry to increasing packing densities. **Aquaculture Research** 37, 472–476, 2006
- CHOWDHURY, S., & SAIKIA, S. K. Oxidative stress in fish: a review. **Journal of Scientific Research**, 12(1), 145-160. 2020
- COLT, J. E.; AND J. R. TOMASSO. Hatchery water supply and treatment. In Fish hatchery management, ed. G. A. Wedemeyer. Seattle: **American Fisheries Society**, PP. 751. 2002
- COSTA, J. D. S.; SILVA, H. N. P. D.; SOUSA, E. M. D. O. et al. The use of *Myrcia sylvatica* hydrolate (G. MEY.) DC.(Myrtaceae) as a sedative under simulated conditions of transport of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Applied Aquaculture**, 33(4), 360-372, 2021.
- ELLIS, T.; YILDIZ, H.Y.; LÓPEZ-OLMEDA, J. et al. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, 38,(163-188). 2012
- FARIA, R.H.S.; MORAIS, M.; SORANNA, M.R.G.S.; SALLUM, W.B. Manual de Criação

de peixes em viveiros. Brasília: Codevasf, p.60-62, 2013

GOLOMBIESKI, J.I.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. et al. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture** 216: 95– 102. 2003

GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; DA COSTA, S. T. et al. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. **Fish Physiology and Biochemistry**, 41, 463-472. 2015

HACKE, A.C.M.; MIYOSHI, E.; MARQUES, J.A. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). **J Ethnopharmacol** 260:113036. 2020 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>

HOHLENWERGER, J. C.; BALDISSEROTTO, B.; COUTO, R. D. et al . Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, 47. 2016

HOHLENWERGER, J.C.; BALDISSEROTTO, B.; COUTO, R.D. et al. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, 47(3): e20160040. 2017 <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160040>.

INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, O.T. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta amazonica**, 41 (2), 327 – 332. 2011

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A.; & FINSTAD, B. Potential benefit of sedation with clove oil on animal welfare during transport of salmon *Salmo salar* L. and transfer to the sea. **Aquaculture Research**, 40(2), 233-241. 2009

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, R. S. et al. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the transport of commercial well vessels and effects on survival after transfer to sea. **Aquaculture**, 243(1-4), 373-382. 2005

JÚNIOR, J.R.C.; CARVALHO, N. A. S. S., NUNES, J. L. G. et al. Sobre a pesca de peixes ornamentais por comunidades do rio Xingu, Pará-Brasil: relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 521-530, 2009.

KIZAK, V.; CAN, E.; CAN, S. S.; & ÖZÇIÇEK, E. Anesthetic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil as a herbal agent in two ornamental fish species. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 70. 2018

LEIRA, M.H.; CUNHA, L.T.; BRAZ, M.S. et al. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **PUBVET. Medicina Veterinária e Zootecnia** 11: 11-17. 2017

LOPEZ-ROMERO, J.C.; GONZÁLEZ-RÍOS, H.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2015, 9p.

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

<https://doi.org/10.1111/are.13136>.

McDONALD, G.; & MILLIGAN, L. Regulação iônica, osmótica e ácido-base no estresse. *Estresse e saúde dos peixes na aquicultura*, 62, 119-145. 1997

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, 247, (3170-3175). 1972 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)

MIRZARGAR, S. S.; TAHERI MIRGHAED, A.; HOSEINI, S. M. et al. Biochemical responses of common carp, *Cyprinus carpio*, to transportation in plastic bags using thymol as a sedative agent. **Aquaculture Research**, 53(1), 191-198. 2022

OHARA, A. (2006). *Free radicals: good, bad and natural*. Text Workshop

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, 95, (351-358). 1979 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

OLADEJI, O.S.; ADELOWO, F.E.; AYODELE, D.T. et al . Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scient Afric** 6:00137. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>

OLIVEIRA, C.P.B.; LEMOS, C.H.P.; FELIX E SILVA, A. et al. Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture** 513:734409.2019 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734409>

OLIVEIRA, I. C.; OLIVEIRA, R. S. M.; LEMOS, C. H. D. P. et al. Essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Lippia sidoides* in the anesthetic induction and transport of ornamental fish *Pterophyllum scalare*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 48(3), 501-519. 2022

PANKHURST, N.W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 265–275. 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/j.yggen.2010.07.017>

PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.D.; BECKER, A.G. et al. 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, (323-334). 2014

PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, E. C.; SOUSA, E. M. O.; SILVA, H. N. P. et al. Lethal concentration of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil for *Dolops discoidalis* and *Argulus sp.*(Crustacea: Argulidae). **Journal of fish diseases**, 43(12), 1497-1504. 2020

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry** 11, 1163–1182. 2012

RIBEIRO, A. S.; BATISTA, E. D. S.; DAIRIKI, J. K. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n.

1, p. 1-7, 2016.

SACCOL, E.M.H.; JEREZ-CEPA, I.; OURIQUE, G.M. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, 117,(150-160). 2018 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.009>

SALBEGO, J.; BECKER, A. G.; PARODI, T. V. et al. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 437, 46-50. 2015

SENA, A. C.; TEIXEIRA, R. R.; FERREIRA, E. L. et al. 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. 2016

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E. Ö.; & ÜNER, N. Evaluation of the toxicity of ethoxazole in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Biochemistry and physiology of pesticides**, 78(1), 1-8. 2004

SILVA, H.N.P.; MACHADO, S.D.D.S.; SIQUEIRA, A.M.D.A. et al. Sedative and anesthetic potential of the essential oil and hydrolate from the fruit of *Protium heptaphyllum* and their isolated compounds in *Colossoma macropomum* juveniles. **Aquaculture**, 529, (735629). 2020 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735629>

SILVA, H.N.P.; SOUSA, E.M.D.O.; MAIA, J.L.D.S. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae) hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. **Aquaculture Research** 2017 <https://doi.org/10.1111/are.13441>.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1 out. 1968.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids** 25, 207–218. 2003 <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>

SUMMERFELT, S.T.; VINCI, B.J.; PIEDRAHITA, R.H. Oxygenation and carbon dioxide control in water reuse systems. **Aquacult. Eng.** 22, 87–108. 2000

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. **Boletim Instituto de Pesca** 44:17– 24. 2018 <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.263>

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. **Rev. Aquac.** 10, 351–369. 2018 <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.

VANDERZWALMEN, M.; EATON, L.; MULLEN, C. et al. The use of feed and water

additives for the transport of live fish. **Comments on Aquaculture**, 11(1), 263-278. 2019

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Veterinaria Medicina**, v.50, n.6, p.269-275, 2005.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z.H. et al . Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture** 310, 369–375. 2011 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>.

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.

ZALL, D. M.; D. FISHER.; M. Q. GARNER. Photometric determination of chlorides in water. **Analytical Chemistry** 28:1665–68, 1956 doi:10.1021/ac60119a009.

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

4.8 Conclusões e Considerações Finais

O uso do óleo essencial de OECC 100 mg/L é recomendado para anestésiar juvenis de tambaqui em atividades de manejos rápidos, uma vez que promoveu anestesia (<3 minutos) e recuperação em tempo inferior a 10 minutos. Além disso, não houveram mortalidade nos animais expostos ao OECC, e de maneira geral melhorou os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo, estimulou a atividade antioxidante de substâncias como SOD e GSH nos tecidos, com menores danos ao metabolismo lipídico (TBARS), portanto reduzindo os efeitos deletérios causados pela manuseio biométrico.

No transporte de juvenis de tambaqui recomenda-se o uso de 8 mg/L de OECC como sedativo, uma vez que reduziu a excreção de amônia e perda de íons de Cl^- e K^+ . Além disso, foi possível observar melhores condições antioxidantes com uso do OECC, constatados pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, em resposta as substâncias oxidantes do estresse, minimizando os efeitos deletérios decorrentes do transporte. No entanto são necessários mais estudos investigativos sobre o emprego do OECC na fisiologia do tambaqui, como a avaliação dos parâmetros plasmáticos, histopatológicos branquial e genéticos envolvidos no estresse.