



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* NO MANEJO E TRANSPORTE DE  
TILÁPIA DO NILO**

**JANIS CUMMING HOHLENWERGER**

**SALVADOR- BAHIA  
JANEIRO/2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* NO MANEJO E TRANSPORTE DE  
TILÁPIA DO NILO**

**JANIS CUMMING HOHLENWERGER**

**SALVADOR – BA  
JANEIRO – 2015**

**JANIS CUMMING HOHLENWERGER**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* NO MANEJO E TRANSPORTE DE  
TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Copatti  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati

**SALVADOR – BA  
JANEIRO – 2015**

**JANIS CUMMING HOHLENWERGER**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* NO MANEJO E TRANSPORTE DE  
TILÁPIA DO NILO**

**Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 30 de  
janeiro de 2015.**

**Comissão Examinadora:**

---

**Dr. Carlos Eduardo Copatti**  
UFBA  
Presidente

---

**Dr. Luís Vitor Oliveira Vidal**  
UFBA

---

**Dr. André Luis da Cruz**  
UFBA

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

página

**Figura 1** - Tempos de indução e recuperação anestésica em exemplares de tilápia do Nilo submetidos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*. A:  $y = 61,979 - 0,0912x$ ;  $R^2 = 0,743$ . B:  $y = 1325,624 - 2,514x$ ;  $R^2 = 0,930$ ; C:  $y = -413,22 + 3,70x - 0,005 x^2$ ;  $R^2 = 1$ . Onde  $y$  = tempo e  $x$  = óleo essencial de *L. alba*.....**24**

**Figura 2** - Efeito do óleo essencial de *Lippia alba* ( $500 \mu\text{L/L}^{-1}$ ) sobre os níveis plasmáticos de glicose, cortisol e atividade da paraoxonase em exemplares de tilápias do Nilo expostas ao estresse (1min) nos tempos 0, 1 e 4h. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo.....**26**

### Capítulo 2

página

**Figura 1** - Níveis plasmáticos de glicose, cortisol e atividade da paraoxonase em tilápias do Nilo antes e após o transporte (8 h) submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*. As letras minúsculas mostram as diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).....**47**

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

#### Página

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros de qualidade da água antes e após o transporte de exemplares de tilápia-do-Nilo submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .....	<b>44</b>
<b>Tabela 2</b> - Frequências ventilatórias (movimentos operculares por minuto) em tilápia-do-Nilo submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .....	<b>45</b>

## SUMÁRIO

Página

### Óleo essencial de *Lippia alba* na produção de tilápias do nilo: manejo e transporte

Introdução Geral .....	08
Revisão de literatura Geral .....	09

#### Capítulo 01

O uso de *Lippia alba* como anestésico para manejo de tilápia do Nilo

Resumo .....	16
Abstract .....	17
Introdução .....	18
Material e Métodos .....	20
Resultados e Discussão .....	24
Conclusões .....	30
Referências Bibliográficas .....	31

#### Capítulo 02

Uso da *Lippia alba* em transporte de tilápia-do-Nilo

Resumo .....	37
Abstract .....	38
Introdução .....	39
Material e Métodos .....	41
Resultados e Discussão .....	44
Conclusões .....	50
Agradecimentos.....	50
Referências Bibliográficas .....	51
Considerações Finais.....	55
Referências Bibliográficas.....	56



## INTRODUÇÃO GERAL

Nos procedimentos em piscicultura, os peixes são facilmente estressados nas diferentes etapas de criação. Atividades rotineiras de manejo e sua intensidade ou duração provocam respostas ao estresse que podem resultar em consequências indesejáveis, como a redução das taxas de crescimento, perda de peso, doenças e até mortalidade (BARCELLOS et al., 2000; IWAMA et al., 2004). Assim, o uso de anestésicos se faz importante para prevenir injúrias físicas e promover a redução do estresse, resultando no bem-estar para os peixes (ANSCHAU et al., 2014).

Um anestésico desejável é aquele que proporciona uma ótima sedação, sem provocar efeitos tóxicos nos peixes ou no ambiente. Isso torna o óleo essencial (OE) de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown importante no estudo sobre anestesia em peixes por possuir um eficaz efeito tranquilizante e relaxante (CUNHA et al., 2010) e por ser uma alternativa ao uso de substâncias químicas, sendo seguro para consumidores e meio ambiente (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013).

A tilápia-do-Nilo provoca machucados frequentes em seus manipuladores através dos espinhos ósseos presentes nas nadadeiras (VIDAL et al., 2008). Além disso, a movimentação excessiva dentro das embalagens de transporte pode provocar desgaste energético e aumento nos níveis de cortisol, prejudicando seu sistema imunológico (BARCELLOS et al., 2004).

Dessa forma, este trabalho objetivou determinar a melhor concentração do OE de *L. alba* para a indução e recuperação anestésica, avaliar sua ação através da análise de parâmetros bioquímicos e hormonais como anestésico durante o manejo de tilápias do Nilo e como sedativo em situação de transporte.

## REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### ESTRESSE EM PEIXES

São considerados estressores aqueles estímulos que provocam alterações fisiológicas ou comportamentais de forma exacerbada em animais, prejudicando a alimentação, crescimento, reprodução e outros aspectos da fisiologia normal (ROSS e ROSS, 2008). Em peixes, essa resposta ao estresse é induzida pelos diversos agentes estressores presentes no sistema de produção como a qualidade da água, procedimentos de manejo e transporte, alimentação e densidade populacional (OBA et al., 2009) e essa situação de estresse em aquicultura pode levar a alta debilidade e mortalidade prejudicando o sistema produtivo (ROSS e ROSS, 2008).

As respostas hormonais ao estresse em peixes são mediadas pelo sistema adrenérgico e o eixo hipotálamo-hipófise. Após o evento estressante, segue-se a estimulação nervosa e conseqüentemente a liberação de catecolaminas (adrenalina) na corrente sanguínea que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico, e posterior liberação do cortisol (ROSS e ROSS, 2008).

A resposta ao estresse é variável, sendo caracterizada por uma fase de respostas fisiológicas ao evento estressor, seguido por uma tentativa de adaptação do organismo ao estresse, portanto a resposta ao estresse é uma forma de adaptação que promove uma chance de sobrevivência frente uma situação de medo ou ansiedade (OBA et al., 2009) . Mas a depender da duração de exposição ao evento estressor, essas fases podem ser seguidas de uma fase de esgotamento fisiológico que pode comprometer a saúde e até a vida dos peixes (ROSS e ROSS, 2008).

### ANESTÉSICOS EM PEIXES

Anestesia é um estado reversível de depressão do sistema nervoso central, acompanhada de perda sensorial envolvendo hipnose, analgesia, a supressão da atividade reflexa e relaxamento do músculo voluntário. Sedação é um estado preliminar da anestesia em que a sonolência é induzida, com a percepção sensorial entorpecida e com alguma analgesia (ROSS e ROSS, 2008). Em peixes a dose anestésica e o tempo de

exposição determina o estado anestésico desejado. Para manejo a anestesia profunda seria o recomendado e, para o transporte o estágio de sedação já produz o efeito necessário (COOKE et al,2004)

Os peixes se estressam e tentam se desvencilhar durante a contenção e manuseio, isso pode resultar em lesões para os peixes e, em alguns casos, para o manipulador (FIDDES, 2008). Por conta disso, os anestésicos são eficazes em minimizar o estresse dos peixes, contribuindo positivamente para reduzir estímulos visuais, consumo de oxigênio e excreção de amônia.

No transporte são importantes por reduzir a mobilidade dos peixes, evitando lesões traumáticas e ferimentos (WURTS, 1995; INOUE et al., 2005).

A dose correta do anestésico é fundamental para evitar desperdícios ou a morte dos peixes pelo excesso de exposição ao produto, contribuindo assim para uma melhor sanidade dos animais e promoção da saúde dos seus consumidores (ROUBACH e GOMES, 2001). No entanto, a concentração, o tempo de indução e a recuperação, bem como os efeitos adversos que os mesmos podem causar não são conhecidos para a maioria das espécies utilizadas em aquicultura (Z AHL et al., 2009).

As espécies de peixe tem um tempo específico para a indução anestésica conforme a sua fisiologia. Além das diferenças entre as espécies, outros fatores que podem influenciar uma sedação são: a idade do peixe, temperatura da água e estresse (Z AHL et al., 2009). Como existe necessidade de manejos em todas as etapas de desenvolvimento, reprodução, transporte e cirurgias, torna-se necessário estudar a eficiência dos diferentes tipos de produtos anestésicos para que haja menos estresse nos peixes e não ocorram mortalidades nas práticas rotineiras aplicadas aos animais (BITTENCOURT et al., 2012).

As vias de aplicação anestésicas mais comuns são a injetável ou através da água por “inalação”. Em piscicultura a via mais utilizada é inalatória. Segundo Roubach e Gomes (2001), para manejo de peixes é preferível a anestesia profunda principalmente para segurança dos animais e manipuladores, esse estágio deve ser atingido entre 1 a 3 minutos, com tempo de recuperação inferior a 5 minutos. Quando submersos em água contendo anestésicos os peixes passam por alguns estágios anestésicos que podem ser observados na tabela a seguir:

**Tabela 1: Estágios de anestesia em peixes. Adaptado de Small (2003)**

<b>Estágio</b>	<b>Características</b>
<b>1</b>	<b>Sedação. Redução à reação a estímulos externos</b>
<b>2</b>	<b>Perda parcial do equilíbrio. Natação errática</b>
<b>3</b>	<b>Perda total do equilíbrio. Cessa a locomoção</b>
<b>4</b>	<b>Colapso medular (morte). Sem movimentos respiratórios (morte)</b>

A imobilidade dos peixes é conseguida na anestesia profunda (estágio 3), com a perda dos movimentos musculares voluntários. A redução dos movimentos respiratórios, a redução do oxigênio no sangue durante esse estágio, levam a hipóxia e acidose respiratória, e como resultado pode ocorrer diversas alterações fisiológicas em decorrência da anestesia (IWAMA e ACKERMAN, 1994) como a liberação de adrenalina no sangue e aumento dos níveis de cortisol (OBA et al., 2009) fazendo com que o procedimento anestésico seja um estressor em potencial para peixes. Principalmente os anestésicos químicos (KANANI et al., 2013).

#### **Principais agentes anestésicos utilizados em piscicultura**

O MS222 (Tricafina metano sulfonato) é o anestésico para peixe mais difundido no mundo. Sendo um dos poucos anestésicos liberados para uso em peixes destinados ao consumo humano nos EUA pelo Food and Drug Administration (FDA). É solúvel em água, porém é ácido e pode reduzir o pH da água causando efeitos adversos nos peixes como irritação nos olhos e brânquias, diminuição do muco podendo até levar a morte. Além disso, existem relatos do aparecimento de lesões oftálmicas nos manipuladores (ROUBACH e GOMES, 2001). No Brasil, a Benzocaína é o anestésico mais utilizado em manejo de peixes. É muito similar ao MS222, com a vantagem de ser mais seguro para os manipuladores (GOMES et al., 2001; ROUBACH e GOMES, 2001).

O eugenol é um fármaco de origem vegetal, principal componente do óleo de cravo (MAZZAFERA, 2003; SILVA et al., 2011), muito utilizado na medicina em humanos (AFFONSO et al., 2012). O eugenol é uma alternativa para o uso de anestésico em peixes, pois além de eficiente como anestésico para peixes, pode ser utilizado em peixes destinados ao consumo devido a eliminação relativamente rápida do organismo dos peixes (CHO e HEATH, 2000; WOODY et al., 2002), porém deve-se estar atento aos efeitos adversos das dosagens (BITTENCOURT et al., 2012).

No Brasil, a resolução 714, de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, autoriza a eutanásia de peixes com o uso de barbitúricos, CO<sub>2</sub>, triclaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína e 2-fenoxietanol. Mesmo assim, ainda há preocupação com a aplicação dessas substâncias químicas, devido aos resíduos tóxicos nos animais e no ambiente (BITTENCOURT et al., 2012). Como a manipulação dos peixes é imprescindível para o cultivo de animais em ambientes confinados, o uso de substâncias tranquilizantes se faz necessário, por conta disso tem-se procurado alternativas entre as substâncias naturais como os óleos essenciais (ROUBACH et al., 2005; BECKER et al., 2012).

## ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Sua característica principal é a volatilidade, além de ter o aroma agradável e intenso. Estão presentes nas mais diversas partes das plantas e sua composição pode variar de acordo com esta localização. São amplamente utilizados como flavorizantes, em alimento e na indústria de cosméticos (SIMÕES e SPITZER, 2004). Além disso, apresentam um grande potencial medicinal e podem ser usados no desenvolvimento de novas drogas alternativas, pois apresentam um amplo espectro de efeitos farmacológicos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas (SCHERER et al., 2009; MILEZZI et al., 2013) além de efeitos sedativos e anestésicos (CUNHA et al., 2010; BECKER et al., 2012). No entanto, o modo de ação destes óleos ainda é pouco conhecido e pesquisas adicionais se fazem necessárias.

O Brasil ainda tem um número pequeno de medicamentos fitoterápicos registrados contendo espécies de plantas brasileiras, apesar de ter uma das maiores

biodiversidades do mundo e sendo um dos países que publica o maior número de artigos científicos sobre plantas medicinais (CARVALHO et al., 2011). Em piscicultura o estudo com o uso de óleos essenciais tem se mostrado eficiente pela ação antimicrobiana (MILEZI et al., 2013) e anestésica de algumas substâncias (CUNHA et al., 2010)

A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é um subarbusto aromático, pertencente à família Verbenaceae, conhecida popularmente como erva-cidreira é de grande importância na medicina popular brasileira, usada como analgésico, anti-inflamatório, sedativo e antiespasmódico (TAVARES et al., 2011).

Os principais componentes do óleo essencial de *L. alba* são a carvona, limoneno, germacreno D e  $\beta$ -mirceno (TELES, 2010). O óleo essencial de *L. alba* (Eola) é uma alternativa viável para substituir os anestésicos químicos nos peixes (SOARES & TAVARES DIAS, 2013). Estudos já demonstraram eficácia de Eola como anestésico para jundiá (*Rhamdia quelen*) (CUNHA et al., 2010; BECKER et al., 2012) e cavalo marinho (*Hippocampus reidi*) (CUNHA et al., 2011).

## TILÁPIA DO NILO

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe mais produzidas no mundo (WATANABE et al., 2002) e das mais importantes peixes ósseos de água doce para a aquicultura mundial, é o segundo peixe de água doce mais cultivado, superada apenas pela carpa comum (BORGUETTI et al., 2003). O Brasil se destaca entre os maiores produtores respondendo por aproximadamente 56% da produção (EL-SAYED, 2006), principalmente devido a sua rusticidade e boa adaptação às condições de cativeiro (REBELO NETO, 2013).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui características zootécnicas que a favorecem como a espécie mais criada nos sistemas de piscicultura no Brasil (FAO, 2005), devido a sua fácil adaptação a diferentes ambientes, sua rusticidade, excelente performance em ganho de peso e crescimento, além de possuir carne de qualidade superior com poucas espinhas e boa aceitação para o consumo (FIGUEIREDO JR. e VALENTE JR., 2008).

## **CAPÍTULO 1**

## O uso de *Lippia alba* como anestésico para manejo de tilápia do Nilo

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia de óleo essencial de *Lippia alba* (Eola) para a indução e recuperação anestésica e para o manejo de tilápia do Nilo. Foram utilizados 80 exemplares de tilápia do Nilo ( $4,25\text{g} \pm 0,48$ ) submetidos a diferentes concentrações de Eola (10; 20; 50; 100; 200; 300, ou  $500 \mu\text{L L}^{-1}$  e controle) nos testes de indução e recuperação anestésica. A resposta ao estresse foi avaliada por meio de parâmetros plasmáticos (glicose, cortisol, lactato e atividade de paraoxonase) em 54 peixes. A qualidade do filé foi avaliada através da análise sensorial dos peixes amostrados. Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento. Os níveis de glicose no plasma mostraram um aumento significativo em peixes expostos a Eola em 1 e 4 h após a exposição ao estresse. Os níveis de cortisol mostraram uma diminuição significativa em peixes anestesiados 4 h após a exposição ao estresse. A análise sensorial não mostrou diferença significativa no sabor ou odor do filé, indicando que o Eola não altera a qualidade do filé. Eola foi eficaz para induzir a anestesia em tilápia do Nilo a partir da concentração de  $200 \mu\text{L L}^{-1}$ . No entanto, para o manejo, recomenda-se a concentração de  $500 \mu\text{L L}^{-1}$  por apresentar os melhores tempos de indução e recuperação anestésica, além de reduzir o cortisol plasmático após 4 h de manejo.

Palavras-chave: estresse, cortisol, análise sensorial.

## ABSTRACT

We report the optimal concentration of essential oil of *Lippia alba* (hereafter, EOLA) for the induction and recovery of anesthesia in Nile tilapia during handling. 80 specimens of Nile tilapia (4.25 g) were submitted to different concentrations of EOLA (10; 20; 50; 100; 200; 300, or 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  and control) to test anesthetic induction and recovery. Stress response was evaluated through plasmatic parameters (glucose, cortisol, lactate and e paraoxonase activity) in 54 of those fish. A sensory analysis of the fish fillet produced was also performed. The evaluation of the stress management occurred through plasma parameters (glucose, cortisol, lactate and paraoxonase activity). No mortality was observed during the experiment. Plasma glucose levels showed a significant increase in fishes exposed to EOLA in 1 and 4 h after exposure to handling stress. Plasma cortisol levels showed a significant decrease in fishes anesthetized 4 h after exposure to handling stress. Sensory analysis suggested no difference in taste or smell of the fillet, indicating that the EOLA does not alter the quality of fish. EOLA was effective to induce anesthesia in Nile tilapia from the concentration 200  $\mu\text{L L}^{-1}$ . However, for management procedures, we report 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  concentration as ideal – promoting anesthetic induction and recovery without the increase of cortisol and lactate.

Key-words: stress, glucose, cortisol, Sensory analysis.

## INTRODUÇÃO

Em sistemas de piscicultura, estratégias que evitem a exposição de peixes a condições estressantes são necessárias. Atividades rotineiras de manejo e sua intensidade ou duração provocam respostas ao estresse que podem resultar em consequências indesejáveis, como a redução das taxas de crescimento, perda de peso, doenças e até mortalidade (BARCELLOS et al., 2000;. IWAMA et al., 2004).

Anestésicos ajudam a reduzir estímulos visuais, consumo de oxigênio e excreção de amônia em peixes e podem minimizar as taxas de estresse e de mortalidade em piscicultura (WURTS, 1995; INOUE et al., 2003; CUNHA et al., 2010; 2011). Anestesia também é conhecida por ser eficaz na redução da mobilidade de peixe, evitando lesões traumáticas durante o manuseio (INOUE et al., 2005). A escolha do anestésico adequado deve levar em conta a sua viabilidade econômica, praticidade e eficácia (CHO e HEATH, 2000). Apesar de serem comumente usados como anestésico em peixes, produtos químicos causam efeitos colaterais, como a perda de muco, irritação nas brânquias e lesões de córnea. Além disso, podem contaminar o ambiente com resíduos tóxicos (ROUBACH & GOMES, 2001).

A utilização de anestésicos não tóxicos, tais como óleo de cravo e *Lippia alba* tem apresentado resultados satisfatórios (CUNHA et al., 2010; 2011; BECKER et al., 2012; ZEPPENFELD et al., 2014). *Lippia alba* é uma planta medicinal nativa da América do Sul amplamente utilizado como medicamento calmante, antiespasmódico, analgésico, sedativo, ansiolítico e levemente expectorante (BIASI e COSTA, 2003;. TAVARES et al .,2011). O óleo essencial de *L. alba* (Eola) é uma alternativa viável para substituir os anestésicos químicos nos peixes (SOARES e TAVARES DIAS, 2013). Estudos já demonstraram eficácia de Eola como anestésico para jundiá (*Rhamdia quelen*) (CUNHA et al., 2010;. Becker et al., 2012) e cavalo marinho (*Hippocampus reidi*) (CUNHA et al .,2011).

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais importantes de peixes ósseos de água doce para a aquicultura mundial, principalmente devido a sua rusticidade e boa adaptação às condições de cativeiro (REBELO NETO, 2013). Os efeitos anestésicos de Eola sobre a tilápia do Nilo são desconhecidas. O objetivo deste estudo foi determinar a concentração ideal de Eola para a indução e recuperação anestésica em tilápia do Nilo. Adicionalmente, foi verificado o efeito de Eola em

exemplares expostos ao estresse do manejo nos parâmetros: cortisol plasmático, glicose, lactato e atividade paraoxonase, e avaliado a qualidade do filé para consumo através da análise sensorial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo essencial de *Lippia alba*

*Lippia alba* (Mill.) NE Brown foi cultivado em Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil. As partes aéreas da planta foram coletadas em março de 2013. Uma amostra de vouchers (SMDB No. 10050) foi depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM.

O óleo essencial foi extraído a partir das folhas frescas por destilação a vapor, durante duas horas utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Neste método, o destilado é recolhido num tubo de vidro graduado e a fase aquosa é automaticamente reutilizados no balão de destilação (Farmacopeia Britânica 2007). O mesmo foi armazenado a  $-20^{\circ}$  C em garrafas de vidro âmbar.

### Animais

Foram utilizados machos revertidos sexualmente de tilápia do Nilo da linhagem gift. Os exemplares foram adquiridos da Empresa Bahia Pesca, Camaçari-BA. Para os testes de indução e recuperação anestésica foram utilizados 80 juvenis com massa corpórea média de  $4,25 \pm 1,34$  g e  $5,70 \pm 1,00$  cm e para os testes de resposta ao estresse do manejo foram utilizados 54 exemplares com massa corpórea média de  $67,72 \pm 1,58$  g e  $15,47 \pm 1,91$  cm. Os peixes foram mantidos por um período de 14 dias em tanques de 250 L para aclimação, onde foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial.

Os tanques com os peixes possuíam aeradores ligados 24h/dia. Era realizada troca parcial (70%) da água 2 vezes por semana. Parâmetros de qualidade da água foram aferidos para: alcalinidade ( $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ), dureza ( $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ), amônia ( $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ NHO}_3$ ), pH (7,5), oxigênio dissolvido ( $7,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ ) e temperatura ( $26^{\circ}\text{C}$ ).

A alimentação foi interrompida 24 h antes do início dos experimentos. As avaliações ocorreram no Laboratório de Manutenção de Organismos Aquáticos da Universidade Federal da Bahia. Todos os procedimentos amostrais foram aprovados pelo protocolo nº 04/2012 da Comissão de Ética do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

## Indução e recuperação anestésica

Os peixes foram transferidos para aquários de 2 L de água e o Eola em concentrações de 10, 20, 50, 100, 200, 300 ou 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , diluídas em etanol (1:10). O grupo controle foi transferido para aquários que continham apenas etanol na concentração equivalente à diluição utilizada para 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Para avaliar o tempo necessário para a indução da anestesia, 10 juvenis foram usadas para cada concentração testada. Em cada aquário foram colocados dois peixes ao mesmo tempo, observados separadamente e o tempo de indução em diferentes fases da anestesia foi avaliada de acordo com Small (2003).

Os animais foram observados até 30 minutos após a indução e depois transferidos para aquários livres do anestésico (20 L) e o tempo de recuperação da anestesia foi medido. As observações foram realizadas sempre de forma padronizada por dois observados treinados.

## Avaliação do estresse durante o manejo

A avaliação do estresse durante o manejo ocorreu de acordo com Marking e Meyer (1985). Assim, 27 animais foram transferidos para aquários de 5 L (um peixe de cada vez) e eles foram anestesiados com 500  $\text{mg L}^{-1}$  do Eola (baseado no tempo de indução e recuperação da anestesia, ver Resultados).

Após a anestesia, os peixes foram manipulados para aferição das medidas biométricas, e exposto ao ar durante 1 min. Após a biometria, foi colhido sangue da veia caudal de nove juvenis (tempo 0 h). Os 18 peixes restantes foram colocados em dois tanques de 250 L. Amostras de sangue foram coletadas em nove peixes 1 h após a anestesia e de outros nove peixes 4 h após anestesia. O grupo controle (sem adição de Eola) foi sujeito aos mesmos procedimentos que o grupo teste.

## Análise bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas usando uma seringa Hamilton, e transferido para tubos de 2 mL de plástico e centrifugado 3000 vezes por g (15 min) para separar o plasma. As amostras foram então mantidas congeladas. As amostras de plasma foram enviadas para o Laboratório de Extensão em Análises Clínicas do Instituto de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, onde cortisol, glicose, lactato e atividade paraoxonase foram analisadas.

A determinação de cortisol plasmático ocorreu através do cortisol S kit em um equipamento mini-VIDAS®, um teste automatizado para a determinação quantitativa de cortisol, plasma ou urina, utilizando a técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

A determinação de glicose plasmática foi enzimaticamente determinadas por glicose oxidase/glicose peroxidase, um método colorimétrico usando um equipamento totalmente automatizada (BT 3000; Wiener Lab, Rosario - Argentina).

A determinação de lactato plasmático foi determinado utilizando um analisador totalmente automático, Vitros 250 Dry Chemistry System, Ortho Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson, USA). O limiar de lactato foi definido como a maior potência de saída acima da qual a concentração de lactato no plasma mostrou um aumento sustentado superior a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

A atividade da paraoxonase foi determinada de acordo com o método descrito por Mackness et al. (1998) e Senti et al. (2003). O resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorvâncias pelo fator.  $\text{Fator} = \text{VTR (mL)} / \epsilon_{405} \times \text{VA(mL)} \times \text{E(cm)}$ , onde : VTR – volume total da reação; VA – volume da amostra; E – espessura da cubeta;  $\epsilon_{405} = 1805 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Logo, atividade da paraoxonase = Fator x  $\Delta\text{abs/min}$ .

## Análise sensorial

Após a coleta de sangue, os animais pertencentes ao grupo 0 h foram mortos por decapitação e os filés foram preparados. Foi feita uma comparação de sabor e odor entre os filés de peixe do grupo controle e os filés de peixes expostos a  $500 \text{ mL L}^{-1}$  de Eola.

Utilizou-se o método padrão tal como descrito por Costell (2002). Os filés foram aquecidos em forno de microondas (porções de 20 g para 1 min) e avaliados por 33 avaliadores não treinados. As amostras foram codificadas por números aleatórios e apresentados com um controle oculto. O grau de gosto e odor de diferença do controle foi medida usando uma escala de sete pontos, em que 1 = substancialmente melhor que o controle; 2 = moderadamente melhor do que controle; 3 = um pouco melhor do que o controle; 4 = não diferente de controle; 5 = um pouco pior do que o controle; 6 = moderadamente pior do controle; e 7 = substancialmente pior do que o controle.

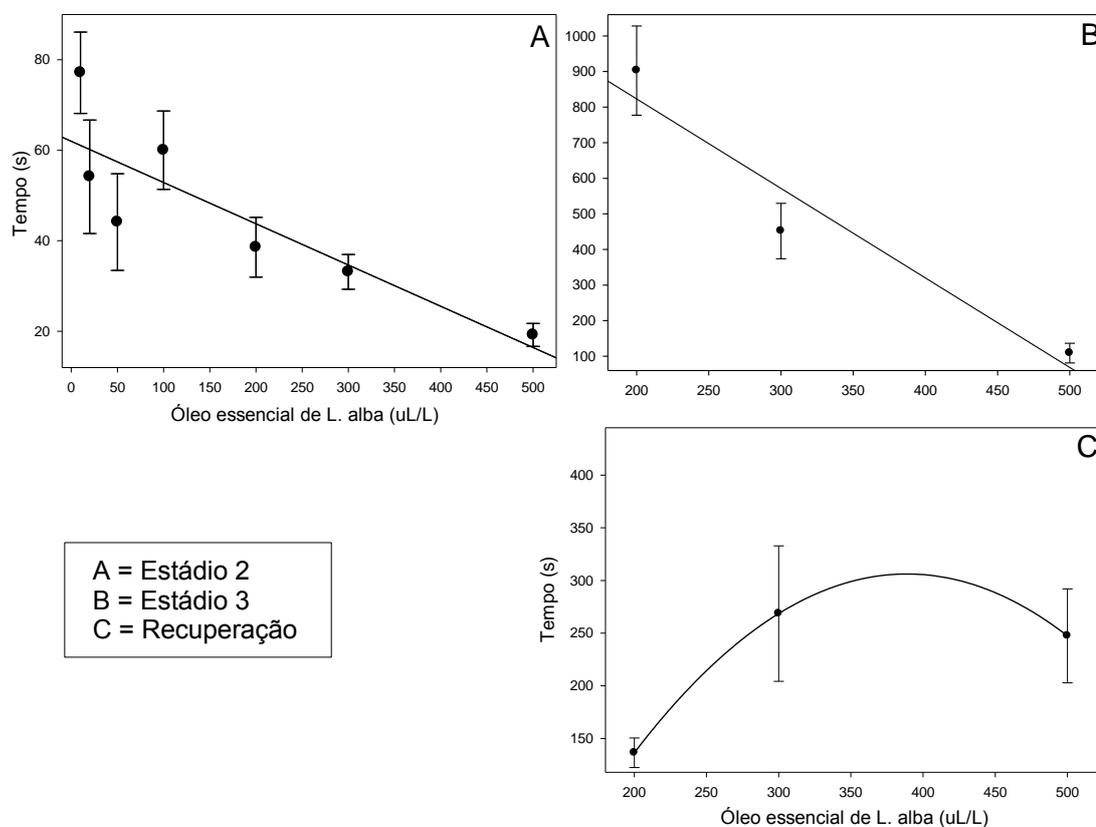
#### Análise estatística

Todos os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. Para verificar a homogeneidade das variâncias, todos os dados foram submetidos a um teste de Levene. A normalidade dos dados foi avaliada através de um teste de Shapiro-Wilk. Avaliação da atividade anestésica foi realizada pela análise de regressão (concentração X tempo), utilizando o software Sigma Plot (versão 8.0). O cortisol, lactato, glicose e atividade paraoxonase foram analisados usando uma ANOVA de duas vias por testes de Tukey post hoc. As análises sensoriais foram realizadas utilizando uma análise de variância one-way, seguido pelo teste t de Student. Foi utilizado para análises Software Statistica (versão 8.0) e a significância foi estabelecida em um nível de 95% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os experimentos, nenhuma mortalidade foi observada. A concentração de Eola mostrou ser inversamente proporcional ao tempo necessário para a indução da anestesia. No entanto, o aumento da concentração resultou em aumento do tempo necessário para a recuperação. Além disso, o Eola mostrou indução anestésica em todas as concentrações testadas e naqueles acima de 200 mL L<sup>-1</sup> ocorreu a anestesia profunda. A concentração de 500 mL L<sup>-1</sup> de Eola teve o menor tempo de indução (Figura 1). A aplicação de 500 ul de L<sup>-1</sup> de etanol para o grupo controle não produziu efeito anestésico.

Figura 1 - Tempos de indução e recuperação anestésica em exemplares de tilápia do Nilo submetidos a diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba*. A:  $y = 61,979 - 0,0912x$ ;  $R^2 = 0,743$ . B:  $y = 1325,624 - 2,514x$ ;  $R^2 = 0,930$ ; C:  $y = -413,22 + 3,70x - 0,005 x^2$ ;  $R^2 = 1$ . Onde  $y$  = tempo e  $x$  = óleo essencial de *L. alba*.



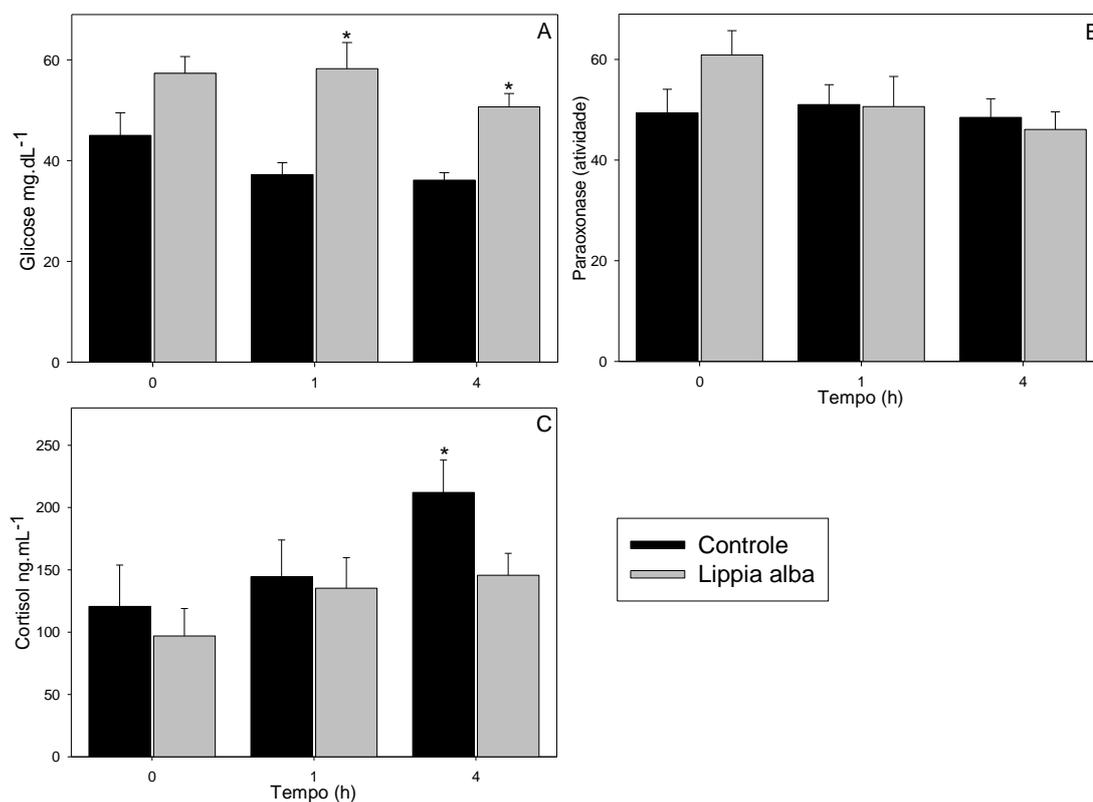
As tilápias do Nilo que foram anestesiadas com  $500 \mu\text{L L}^{-1}$  de Eola apresentaram níveis de glicose plasmáticos significativamente mais elevados do que o grupo controle em 1 e 4 h após o manejo. No entanto, em comparação com tempo 0 h, não houve diferença significativa nos níveis de glicose plasmática (Figura 2a).

Os níveis de cortisol plasmático de exemplares de tilápia do Nilo anestesiados foram significativamente inferiores aos do grupo controle em 4 h após o manejo (Figura 2b). Não ocorreram diferenças significativas nos níveis de cortisol plasmático entre os grupos com ou sem anestesia, nos tempos 0 e 1 h.

A atividade da paraxonoase foi semelhante em todos os grupos analisados para qualquer tempo (Figura 2c).

O mesmo foi verificado para o lactato plasmático. Os níveis plasmáticos de lactato foram inferiores a  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , exceto para os peixes anestesiados no tempo 0 h ( $0,78 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *Lippia alba* ( $500 \mu\text{L/L}^{-1}$ ) sobre os níveis plasmáticos de glicose, cortisol e atividade da paraoxonase em tilápias do Nilo expostas ao estresse (1min) nos tempos 0, 1 e 4h. \* Indica diferença significativa entre os tratamentos em um mesmo tempo.



Os filés de peixe que foram preparados a partir de tilápias do Nilo que tinham sido anestesiados com o Eola receberam notas sensoriais de odor ( $4,13 \pm 0,11$ ) e sabor ( $3,65 \pm 0,09$ ), semelhantes aos dos peixes controle ( $3,82 \pm 0,16$  e  $3,76 \pm 0,14$ , respectivamente), isto é, sem apresentar diferença significativa.

O presente estudo demonstra que Eola tem efeito anestésico em tilápias do Nilo. A sedação é um estado inicial de anestesia em que a percepção sensorial é reduzida, mas não há nenhuma perda de equilíbrio. Em animais anestesiados existe perda generalizada de percepção sensorial e perda de equilíbrio (ROSS e ROSS, 1999). Neste estudo, a sedação ocorreu em todas as concentrações testadas e a anestesia a partir de  $200 \text{ mL L}^{-1}$ , sendo que  $500 \text{ mL L}^{-1}$  de Eola foi a concentração com a indução anestésica mais rápida. Nesta concentração, os tempos de indução e recuperação foram 109 e 247 s,

respectivamente. De acordo com Marking & Meyer (1985), os tempos de indução e recuperação da anestesia deve ser inferior a 180 e 300 s, respectivamente.

A sensibilidade para o Eola varia de acordo com a espécie e a concentração. Para a indução e recuperação anestésica em cavalos-marinhos é indicado 150-300 mL L<sup>-1</sup> (CUNHA et al., 2011), já em jundiá é 300-500 mL L<sup>-1</sup> (CUNHA et al., 2010).

Parâmetros bioquímicos fornecem informações importantes sobre a resposta ao estresse em peixes, bem como a sua capacidade de responder ao estresse (MOMMSEN et al., 1999; ACERETE et al., 2004). Assim, os níveis de cortisol, glicose, lactato e atividade de paraoxonase foram analisados.

O aumento nos níveis de glicose após o estresse ocorre em geral em resposta a adrenalina no sangue, causando glicogenólise hepática e muscular (BARCELLOS et al., 2004; DIAZ GONZÁLEZ e SILVA, 2006). O aumento da glicose no sangue devido à resposta ao estresse agudo que os peixes sofrem durante o manuseio (DIAZ GONZÁLEZ e SILVA, 2006; COSTAS et al., 2011), contribui para o aumento da demanda de energia após o estresse (BARCELLOS et al., 2004; DIAZ GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

Houve um aumento significativo na glicose plasmática nos tilápias do Nilo submetidos à anestesia no grupo controle em 1 e 4 h após a administração procedimento de manejo. Esta hiperglicemia em tilápias-do-Nilo, segundo Silva et al. (2012), pode ser associada com um aumento na atividade de peixe (natação) ou uma redução da disponibilidade de oxigênio no primeiro momento de exposição ao anestésico.

Outros autores também relatam que os níveis de glicose no plasma aumentaram 24 horas após a anestesia com eugenol em salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e *Seriola dumerilii* (CHO e HEATH 2000;. Wagner et al., 2003; MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). O mesmo foi verificado em anestesia pelo óleo essenciais de *Hesperozygis ringens* e Eola em jundiá (TONI et al., 2013). Este aumento dos níveis de glicose no plasma pode representar uma resposta energética adaptativa durante um evento estressante (PANKHURST, 2011). Por outro lado, exemplares de matrinxã (*Brycon cephalus*) apresentaram redução da glicemia após exposição a 60 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína (10 min) (INOUE et al., 2004). Sanches et al. (2014) explicam que, independentemente da substância utilizada e da concentração, os

níveis de glicose no plasma em peixes são mais elevados no início da anestesia e, gradualmente, retornam aos níveis normais. Contudo, neste estudo, apesar dos níveis de glicose não diferirem significativamente entre os tempos de zero, 1 e 4 h nos peixes anestesiados, tais níveis não foram equivalentes aos encontrados para os exemplares não anestesiados com 1 e 4 h após a exposição ao estresse de manejo.

Apesar do aumento da glicose no sangue, nos peixes anestesiados, os níveis de cortisol e lactato e atividade de paraoxonase mantiveram-se semelhante aos do grupo controle ou significativamente menor, no caso de cortisol 4 horas após o estresse de manejo.

Quando os peixes são expostos a estressores, acontece a ativação neuroendócrina (hipotálamo-hipófise), e ocorre a liberação de corticosteroides (cortisol). Em peixes, o aumento do cortisol está relacionado à hiperglicemia, redução do crescimento e supressão dos sistemas imunológico e reprodutivo (OBA et al., 2008; COSTAS et al., 2011). Neste estudo, peixes expostos a 500 mL L<sup>-1</sup> de Eola reduziram níveis de cortisol, e, portanto de estresse, em relação ao grupo controle, após 4 h de exposição. Tal resultado indica que o aumento da glicose plasmática pode ter ocorrido devido a uma maior demanda de energia após a anestesia e não a uma resposta ao estresse propriamente dita.

Semelhante ao presente estudo, Cunha et al. (2010) relatam diminuição significativa nos níveis de cortisol plasmático em jundiás anestesiados com 300 mL L<sup>-1</sup> de Eola, quando comparado ao grupo controle e concluíram que Eola pode reduzir o estresse primário. Mudanças no cortisol plasmático também foram relatadas para adultos Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) anestesiados com MS222 e eugenol (PALIĆ et al. 2006).

A atividade da paraoxonase é importante para a proteção contra o estresse oxidativo, impedindo alterações na resposta imunológica e nas proteínas plasmáticas totais (Ming et al., 2012; Correia & Perry, 2010). Entretanto, existem poucos estudos sobre atividade da paraoxonase em peixes. Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) está associada ao colesterol HDL e mecanismos de proteção cardiovascular (FOLLY et al., 2001). Neste estudo não foi encontrada diferença significativa na atividade paraoxonase, indicando que a exposição ao anestésico não interferiu neste mecanismo de proteção ao estresse oxidativo.

O estresse agudo causado pelo manejo pode resultar num aumento rápido na concentração de lactato no plasma (OBA et al., 2009). O lactato é o produto final da glicólise anaeróbia durante exercício intenso ou estresse, devido a oxigenação muscular insuficiente ou alteração na respiração (DIAZ GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

As concentrações de lactato plasmático não diferiram significativamente entre os tratamentos neste estudo, sendo geralmente inferiores a  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Este valor é semelhante aos parâmetros normais relatados por Welker et al. (2007) para a tilápia do Nilo ( $0,41 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e indica que o Eola não altera o uso da via metabólica anaeróbia. Diferente deste estudo, Toni et al. (2013) verificaram que o óleo essencial de *H. ringens* e Eola para jundiás apresentaram valores significativamente mais elevados de lactato em 0 e 1 h após a exposição, em comparação com o grupo controle, mas retornaram aos níveis basais após 4 h. Iversen et al. (2003) e Inoue et al. (2011), também verificaram maiores níveis de lactato em tambaqui (*Colossoma macropomum*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) anestesiados com eugenol e óleo de cravo, respectivamente, quando comparados aos peixes não anestesiados.

Para peixes utilizados em piscicultura, como é o caso da tilápia-do-Nilo, além das verificações de indução e recuperação anestésica e de parâmetros bioquímicos relacionados ao uso de energia e estresse, Ribas et al. (2007) explicam que a análise sensorial é uma referência importante, uma vez que a qualidade do filé de peixe é crítica em sistemas de produção de peixes.

A análise sensorial realizada neste estudo demonstra que a qualidade do peixe é mantida após anestesia com Eola. Similar a este estudo, Cunha et al. (2010) não constataram alteração no sabor e no odor após o uso de Ela em jundiá. Por outro lado, a utilização de eugenol, tem sido relatado como responsável por alterações no gosto e odor em filés de tilápia (SIMÕES et al., 2010) e jundiá (CUNHA et al., 2010b).

## CONCLUSÃO

Embora os efeitos da anestesia já possam ser percebidos por uma concentração de 200 mL L<sup>-1</sup> de Eola, os resultados deste trabalho indicam que a concentração ideal de Eola para anestesia tilápia do Nilo é de 500 mL L<sup>-1</sup>, que embora ocasione uma maior demanda energética, apresenta os melhores tempos de indução e recuperação anestésica, pode colaborar para uma redução do cortisol plasmático após 4 h de exposição ao estresse de manejo e não altera os níveis de lactato e atividade de paraoxonase plasmática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERETE, L.;BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, 237, 167-178, 2004.
- BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, 30, 887-892. 1999.
- BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G. DE; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, 26, 99-111. 2000.
- BARCELLOS L. J.; KREUTZ L. C.; SOUZA C. D., RODRIGUESA L. B.; FIOREZE I, QUEVEDO R.M.;CERICATO, L, SOSO, A. B.; FAGUNDES, M., CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, 237, 229-236. 2004.
- BECKER, A. G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G.; ZEPPEFELD, HEINZMANN, B.M. & BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiol Biochem** 38, 789-796. 2012.
- BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, 33, 455-459. 2003.
- BRITISH Pharmacopeia. 5ª ed, London: The Stationery Office, 2007.
- CHO G. K.; HEATH D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS 222) and oil clove anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Walbaum). **Aquacult Res**, 31, 537-546. 2000.
- COSTAS B, CONCEIÇÃO L. E. C., ARAGÃO C, MARTOS J. A., RUIZ-JARABO I, MANCERA J.M.; AFONSO, A. (Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858 after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, 316: 68 - 76. 2011.

COSTELL, E. A comparison of sensory methods in quality control. **Food Quality and Preference**, 13, 341-353. 2002.

CORREIA, J. D.; PERRY, I. D. S. Modulação dietética da atividade da paraoxonase: revisão de estudos em humanos. **Rev HCPA** 30(3):271-278. 2010.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 306:403-406. 2010.

CUNHA, M. A.; ZEPPEFELD, C. C.; GARCIA, L. O.; LORO, V. L.; FONSECA, M. B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. L.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2107-2114, out, 2010.

CUNHA, M. A.; DA SILVA, B. F.; DELUNARDO, F. A. C.; BENOVI, S. C.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*, **Neotropical Ichthyology**, 9(3): 683-688. 2011.

DIAZ GONZALES, F. H.; SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica veterinária**. Segunda edição, Porto Alegre, Ed. UFRGS, 2006.

FOLLY, E.; BASTOS, V. L. C.; ALVES, M. V.; BASTOS, J. C.; ATELLA, G. C. A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity. **Biochimie** 83 945–951. 2001.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, 33, 5 943-947. 2003.

INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaina no manejo do matrinxã (*Brycon cephalus*). **Biodiversidade Pampeana**, 2, 10-15. 2004.

INOUE, L. A. K. A.; AFONSO, L. O. B.; IWAMA, G. K.; MORAES, G. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazonica**, 35, 289-295. 2005.

- INOUE L. A. K. A.; BOIJINK C.; RIBEIRO P. T.; SILVA A.M.D.; AFFONSO E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazonica** 41(2):327–332. 2011.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY, D.; ELIASSEN, R. The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress reducing capacity. **Aquaculture** 221:549–566. 2003.
- IWAMA, G.; AFONSO, L.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **J Exp Biol** 204:15–19. 2004.
- MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; TURKIE, W.; DURRINGTON, P. N. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. **FEBS Lett.** 423:57-60. 1998.
- MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **Open Mar Biol J** 5:24-33. 2011.
- MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries. **Fisheries**, 10:2-5. 1985.
- MILLA, S.; MATHIEU, C.; WANG, N.; LAMBERT, S.; NADZIALEK, S.; MASSART, S.; HENROTTE, E. ; DOUXFILS, J. ; MÉLARD, C.; MANDIKI, S.N.M.; KESTEMON, P. Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Fish & Shellfish Immunology**;28: 931- 941. 2010.
- MING, J.; XIE, J.; XU, P.; GE, X.; LIU, W.; YE, J. Effects of emodin and vitamin C on growth performance, biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high temperature stress. **Fish & Shellfish Immunology** 32 651- 661. 2012.
- MOMMSEN T.P., VIJAYAN M.M.; MOON T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev Fish Biol Fisher** 9:211–268. 1999.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M., **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Capítulo 8, Embrapa. 2009.

PALIĆ, D.; HEROLT, D.M.; ANDREASEN, C.B.; MENZEL, B.W.; ROTH, J.A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture** 254 675–685. 2006.

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

SANCHES, M.S.S.; RODRIGUES, R.A.; NUNES, A.L.; OLIVEIRA, A.M.S.; FANTINI, L.E.; CAMPOS, C.M. Effect of menthol and eugenol on the physiological responses of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, 35, 4, 1, 2799-2808. 2014.

SENTI, M.; TOMAS, M.; FITO, M.; WEINBRENNER, T.; COVAS, M.I.; SALA, J.; MASIÁ, R.; MARRUGA, T. J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 88:5422–5426. 2003.

SIMÕES, L.N.; PAIVA, G.; GOMES, L.C. Óleo de cravo como anestésico em adultos de tilápias-do- Nilo. **Pesq. agropec. Bras**, 45 12 1472-1477. 2010.

SILVA, R.D.; ROCHA, L.O.; FORTES, B.A.D.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M.C.S. (Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L. sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(1):99-107. 2012.

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.

SOARES, BV.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de Lippia (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.-Artigo de Revisão. **Biota Amazônica**, 3, 1, 109-123. 2013.

REBELO NETO, P. X. **Piscicultura no Brasil Tropical**. São Paulo: Hemus, 187. 2013.

RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B.A.; TORT, L., Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, 269, 250-258. 2007.

- TAVARES, I.B.; MOMENTÉ, V.G.; NASCIMENTO, I.R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, 4, 204–220. 2011.
- TONI, C.; BECKER, A.G.; SIMÕES, L.N.; PINHEIRO, C.G.; LIMA SILVA, L.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiol Biochem**, 40, 701-714. 2013.
- WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; MCKINLEY, R.S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquacult Res** 34:1139–1146. 2003.
- WELKER, T.L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P.H., Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. **Aquaculture** 262 156–162. 2007.
- WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, 26, 80-81. 1995.
- ZEPPENFELD, C C; TONI, C; BECKER, A G.; MIRON, D. S.; PARODI, T.V.; HEIZMANN, B.M.; BARCELLOS, L.J.G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; LORO, V.L.; CUNHA, M.A.; BALDISSEROTTO, B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, 418: 101-107. 2014.

## **CAPÍTULO 2**

## Uso da *Lippia alba* em transporte de tilápias do Nilo

### RESUMO

Em piscicultura, o transporte causa grande estresse nos peixes, podendo levar a lesões traumáticas, redução da imunidade, aparecimento de doenças e morte. Assim, procura-se minimizar os efeitos estressantes causados por esse evento com o uso de substâncias sedativas. O presente estudo objetivou examinar a ação do óleo essencial (OE) de *L. alba* como sedativo na resposta ao estresse para o transporte de tilápia-do-Nilo. Foram utilizados 145 exemplares com massa corpórea média de 80,79 g. Os peixes foram divididos em três tratamentos (em triplicata): controle, 10 e 20  $\mu\text{l L}^{-1}$  de OE de *L. alba*, com densidade de estocagem 15 indivíduos por sacola em transporte de 8 h. Foram verificados os parâmetros físico-químicos, a frequência ventilatória e os valores plasmáticos de cortisol, glicose, lactato e atividade de paraoxonase. Não ocorreu nenhuma mortalidade ou alteração significativa dos parâmetros físico-químicos da água. A análise da frequência ventilatória demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nos tratamentos com uso de OE, principalmente na concentração de 20  $\mu\text{l L}^{-1}$ . Foi verificado um aumento significativo de glicose plasmática no grupo que foi submetido a dose de 10  $\mu\text{l L}^{-1}$  em comparação com os peixes de antes do transporte. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas, antes ou depois do transporte ou entre as doses anestésicas testadas e o grupo controle. A sedação com 20  $\mu\text{l L}^{-1}$  de OE de *L. alba* é segura e indicada para o transporte de tilápia-do-Nilo, por causar redução da frequência ventilatória e não provocar alterações nos parâmetros bioquímicos plasmáticos ou alterar a qualidade da água após 8 h de transporte.

Palavras-chave: frequência ventilatória, cortisol, glicose.

## ABSTRACT

In fish farming, transport causes great stress in fish and can lead to traumatic injuries, decreased immunity, disease onset and death. Thus an attempt was made to minimize the stress effects caused by this event with the use of sedative substances. This study aimed to examine the action of the essential oil (EO) of *Lippia alba* as a sedative in the stress response to transport the Nile tilapia. In total, 145 copies were used with an average weight of 80.79g. The fish were divided into three treatment (in triplicate): control, 10 and 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  (EOLA), with density of 15 fish per packing during 8 h. The physical and chemical parameters were checked as well as the ventilator rate and plasma levels of cortisol, glucose, lactate and paraoxonase activity. There was no mortality or significant change in physical and chemical parameters of water. The analysis of ventilator rate demonstrated a significant reduction in oxygen intake in the treatments with the use of EOLA, particularly for 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  EOLA. A significant increase in plasma glucose was verified in group with 10  $\mu\text{L L}^{-1}$  EOLA in comparison with the fish before the transport. The other parameters were not significantly different before of after transport or between anesthetic doses tested and the control group. Sedation with 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  EOLA is safe and suitable for the transport of the Nile tilapia, to cause reduction in ventilator rate and not cause changes in plasma biochemical parameters or change the water quality after 8h transport.

Key - words: Ventilatory rate, cortisol, glucose

## INTRODUÇÃO

Em estações de piscicultura, o estresse provocado pelo transporte pode levar a redução da imunidade, aparecimento de doenças, lesões traumáticas e morte (BARCELLOS et al., 2004). Assim, procura-se minimizar os efeitos estressantes provocados pelo transporte através da sedação dos peixes com o uso de substâncias anestésicas (COSTAS et al., 2011; COOKE et al., 2004). Muitas substâncias anestésicas utilizadas em piscicultura são químicos como a benzocaína e o MS222 que provocam efeitos adversos, como irritação nos olhos e brânquias dos peixes, além de deixar resíduos no ambiente (ROUBACH e GOMES, 2001). Com isso, o uso de fitoterápicos vem ganhando espaço por reduzirem os efeitos estressantes e serem atóxicos ao ambiente e não provocarem reações prejudiciais aos peixes (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013).

Um anestésico desejável é aquele que proporciona uma ótima sedação, sem provocar efeitos tóxicos nos peixes ou no ambiente. Isso torna o óleo essencial (OE) de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown importante no estudo sobre anestesia em peixes pelo fato de possuir um ótimo efeito tranquilizante e relaxante e ser uma alternativa ao uso de substâncias químicas, sendo seguro para consumidores e meio ambiente (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). A *L. alba* é um subarbusto aromático, pertencente à família Verbenaceae, nativa da América do sul e conhecida popularmente como erva cidreira, sendo muito utilizada na medicina popular pela sua ação sedativa e ansiolítica (TAVARES et al., 2011; BIASI e COSTA, 2003). Estudos em jundiá (*Rhamdia quelen*) mostraram a eficácia do OE de *L. alba* como anestésico e redutor de estresse (CUNHA et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2011; BECKER et al., 2012), sendo também recomendado para o transporte de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*) (CUNHA et al., 2011).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui características zootécnicas que a favorecem como a espécie mais criada nos sistemas de piscicultura no Brasil (FAO, 2005), devido a sua fácil adaptação a diferentes ambientes, sua rusticidade, excelente performance em ganho de peso e crescimento, além de possuir carne de qualidade superior com poucas espinhas e boa aceitação para o consumo (FIGUEIREDO JR. e VALENTE JR., 2008). A tilápia-do-Nilo provoca machucados frequentes em seus

manipuladores através dos espinhos ósseos presentes nas nadadeiras (VIDAL et al., 2008), os quais, também podem perfurar as embalagens de transporte, inclusive a partir de sua fase juvenil. Além disso, a movimentação excessiva dentro das embalagens de transporte pode provocar desgaste energético e aumento nos níveis de cortisol, prejudicando seu sistema imunológico (BARCELLOS et al., 2004), especialmente em transporte de longa duração.

Experimentos com OE de *L. alba* como sedativo e redutor de estresse no transporte nunca foram realizados em tilápia-do-Nilo. Tal uso pode ser uma alternativa para otimizar a produção e reduzir os riscos de perda no transporte. Assim este trabalho tem como objetivo examinar a ação do OE de *L. alba* como sedativo em situação de transporte de longa duração em tilápia-do-Nilo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo essencial de *Lippia alba*

Foi utilizado OE de *L. alba* obtida a partir de cultivo na UFSM, Campus Frederico Westphalen-RS. O espécime testemunha (SMDB nº 10050) está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM. A extração do OE é feita a partir das folhas frescas da planta por hidrodestilação por 2 h usando Clevenger modificado conforme preconiza a British Pharmacopoeia (2007). Neste método, a destilação é recolhida num tubo de vidro graduado e a fase aquosa é automaticamente reutilizada dentro do balão de destilação. As amostras do mesmo foram mantidas em - 20 °C em frascos de vidro âmbar.

### Animais

Foram utilizados 145 machos revertidos sexualmente de tilápia-do-Nilo da linhagem gift com massa corpórea e comprimento médio de  $80,79 \pm 6,69$  g e  $16,69 \pm 1,43$  cm, respectivamente. Os exemplares foram adquiridos da Empresa Bahia Pesca, Camaçari-BA. As avaliações ocorreram no Laboratório de Manutenção de Organismos Aquáticos da Universidade Federal da Bahia.

Os peixes foram mantidos por um período de 10 dias para aclimação em tanques de 250 L. Os tanques com os peixes possuíam aeradores em funcionamento contínuo. A troca parcial da água foi realizada a cada três dias. Os peixes foram alimentados com ração comercial uma vez ao dia. A alimentação foi interrompida 24 h antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos amostrais foram aprovados pelo protocolo nº 04/2012 da Comissão de ética do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

### Transporte

Os peixes foram transportados na densidade de 15 indivíduos por 8 h em embalagens plásticas com capacidade com 10 L de água e o restante completado com oxigênio. Os peixes foram divididos em três tratamentos (com 3 repetições): controle, 10 e 20  $\mu\text{l L}^{-1}$  de OE de *L. alba* (equivalente a zero, 8 e 16  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente, devido a densidade do OE ser em torno de 0,80 – ambos

primeiramente diluídos em etanol (1:10). As concentrações foram definidas com base no experimento de indução e recuperação anestésica (Capítulo 1 desta dissertação), onde as duas concentrações mais baixas capazes de causar sedação foram selecionadas.

Foram realizadas coleta de sangue de 10 peixes antes do transporte, os quais não foram submetidos ao transporte. Dos peixes submetidos ao transporte, ao término deste, foram selecionados aleatoriamente 10 peixes de cada repetição para coleta de amostras sanguíneas. O sangue foi coletado por seringas Hamilton, transferido para tubos plásticos centrifugados a 3000 x g (15 min) para obtenção do plasma. As amostras de plasma sanguíneo foram analisadas no Laboratório de Extensão em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia para cortisol, glicose, lactato e atividade da paraoxonase.

A determinação de cortisol plasmático ocorreu através do cortisol S kit em um equipamento mini-VIDAS®, um teste automatizado para a determinação quantitativa de cortisol, plasma ou urina, utilizando a técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

A determinação de glicose plasmática foi enzimaticamente determinada por glicose oxidase/glicose peroxidase, um método colorimétrico usando um equipamento totalmente automatizado (BT 3000; Wiener Lab, Rosario - Argentina).

A determinação de lactato plasmático foi determinado utilizando um analisador totalmente automático, Vitros 250 Dry Chemistry System, Ortho Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson, USA). O limiar de lactato foi definido como a maior potência de saída acima da qual a concentração de lactato no plasma mostrou um aumento sustentado superior a 0,5 mol L<sup>-1</sup>.

A atividade da paraoxonase foi determinada de acordo com o método descrito por Mackness et al. (1998) e Senti et al. (2003). O resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator.  $\text{Fator} = \text{VTR (mL)} / \epsilon_{405} \times \text{VA (mL)} \times \text{E (cm)}$ , onde : VTR – volume total da reação; VA – volume da amostra; E – espessura da cubeta;  $\epsilon_{405} = 1805 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Logo, atividade da paraoxonase = Fator x  $\Delta\text{abs/min}$ .

Além destas análises, também foram verificados os seguintes parâmetros de qualidade da água das embalagens de transporte: alcalinidade (mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>), dureza

(mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>), amônia (mg L<sup>-1</sup> NHO<sub>3</sub>), pH, nitrito (mg L<sup>-1</sup> N), oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>) e temperatura ( °C).

#### Frequência Ventilatória

Foram utilizados peixes não submetidos ao transporte (oito peixes por tratamento), sob as mesmas concentrações anestésicas dos tratamentos do transporte para avaliação da frequência ventilatória (FV) (adaptado de ALVARENGA e VOLPATO, 1995).

Os peixes (um indivíduo por aquário) foram mantidos durante 8 h em um aquário com 10 L de água para cada tratamento (controle, 10 e 20 µl L<sup>-1</sup> de OE de *L. alba*). Os tempos para avaliar a FV foram: 0; 0,5; 1; 2; 3, 4, 5, 6, 7 e 8 h. A frequência ventilatória por minuto (FV min<sup>-1</sup>) foi quantificada pela contagem de 20 movimentos operculares sucessivos e mediu-se o tempo transcorrido com um cronômetro, conforme Barreto et al. (2003).

#### Análise estatística

Todos os dados são expressos em média ± erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. A normalidade foi verificada por teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de Tukey. Foi utilizado o programa Statistica versão 7.0 (2004), com nível mínimo de significância de 95% (P < 0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os procedimentos experimentais, não houve mortalidade, nem foram observadas lesões traumáticas nos exemplares de tilápia-do-Nilo. Os parâmetros de qualidade da água avaliados não mostraram nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Similar a este estudo, jundiás e cavalos marinhos transportados com OE de *L. alba* também não apresentaram alterações significativas nos parâmetros de qualidade da água (AZAMBUJA et al., 2011; CUNHA et al., 2011). Becker et al. (2012), por sua vez, registraram um aumento significativo de amônia em relação ao grupo controle após o transporte, porém não apresentou toxicidade para os peixes. Os parâmetros de qualidade da água aferidos no presente estudo mostraram que não ocorreram efeitos adversos aos exemplares em 8 h de transporte.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade da água antes e após o transporte de tilápia-do-Nilo submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Antes do transporte</b>	<b>Controle</b>	<b>10 ul L<sup>-1</sup></b>	<b>20 ul L<sup>-1</sup></b>
Temperatura	26	28	28	27
Alcalinidade	50	60	70	70
Dureza	50	50	40	60
Oxigênio dissolvido	9,5	7	7	6
Amônia	1	2,5	2,5	2,5
Nitrito	0	0,5	0,5	0,5
pH	6	6	5,5	6,5

A sedação é importante principalmente em transporte de longa duração, como é caso do presente estudo, pois reduz a mobilidade dos peixes, evitando colisões e lesões (Cunha et al., 2011). O efeito da sedação pode ser determinado pela verificação da FV

(Tabela 2), importante para o registro de estresse nos peixes submetidos a transporte de longa duração. Becker et al. (2012) explicam que esse parâmetro é uma boa ferramenta para avaliar o nível de estresse e o estado de alerta dos peixes, pois a FV é facilmente alterada em casos de estímulos estressantes (BARRETO e VOLPATO, 2011).

Tabela 2 - Frequências ventilatórias (movimentos operculares por minuto) em tilápia-do-Nilo submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*.

Tempo de exposição (h)	Tratamentos		
	Controle	10 uL L <sup>-1</sup> <i>L. alba</i>	20 uL L <sup>-1</sup> <i>L. alba</i>
0	146 ± 20,15 <sup>Aa</sup>	131 ± 19,42 <sup>Aa</sup>	129 ± 17,19 <sup>Aa</sup>
0,5	147 ± 19,80 <sup>Aa</sup>	97 ± 13,54 <sup>Bb</sup>	74 ± 9,49 <sup>Cb</sup>
1	135 ± 18,45 <sup>Aa</sup>	84 ± 11,31 <sup>Bbc</sup>	62 ± 7,87 <sup>Bbc</sup>
2	139 ± 20,02 <sup>Aa</sup>	79 ± 10,70 <sup>Bbc</sup>	47 ± 5,61 <sup>Cc</sup>
3	136 ± 19,62 <sup>Aa</sup>	71 ± 9,09 <sup>Bc</sup>	46 ± 5,76 <sup>Cc</sup>
4	130 ± 18,84 <sup>Aa</sup>	67 ± 8,63 <sup>Bc</sup>	41 ± 5,02 <sup>Cd</sup>
5	124 ± 18,52 <sup>Aa</sup>	67 ± 8,49 <sup>Bc</sup>	43 ± 5,19 <sup>Cd</sup>
6	135 ± 20,11 <sup>Aa</sup>	88 ± 13,35 <sup>Bbc</sup>	46 ± 5,77 <sup>Cc</sup>
7	140 ± 19,77 <sup>Aa</sup>	75 ± 9,52 <sup>Bbc</sup>	50 ± 6,53 <sup>Cc</sup>
8	143 ± 21,08 <sup>Aa</sup>	74 ± 9,64 <sup>Bbc</sup>	49 ± 5,94 <sup>Cc</sup>

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos no mesmo tempo ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas no mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ).

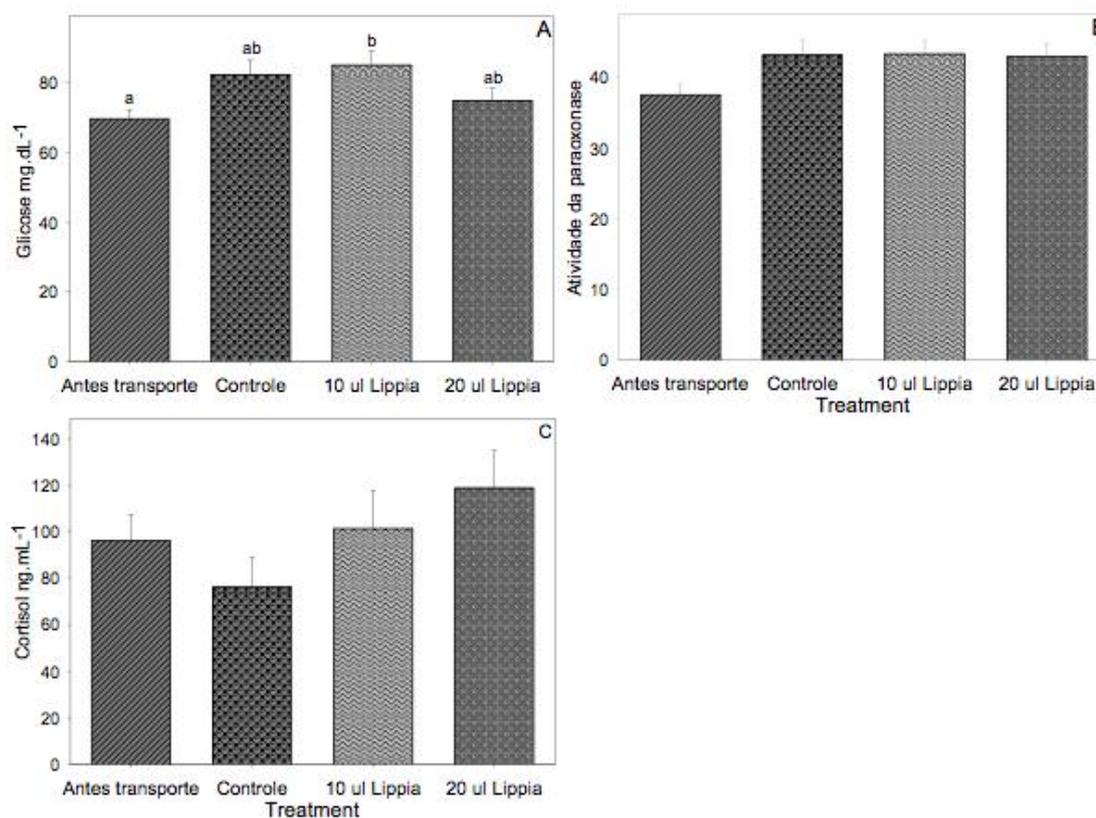
Sabe-se que a tilápia-do-Nilo reage a estímulos externos (BARRETO et al., 2003). Neste estudo, não foram observadas alterações significativas da FV nos tempos do grupo controle. Além disso, em todos os tempos observados do grupo controle foi observada uma FV superior ao descrito por Barreto e Volpato (2011) em tilápia-do-Nilo, entre 96 – 109 bpm e FV média de 97,6 batimentos por minuto (bpm). A FV oscilou entre 124 e 147 bpm nas tilápias-do-Nilo do grupo controle do presente estudo, o que indica que os peixes estão respondendo a uma situação de estresse.

Em geral, o grupo controle, apresentou FV superiores aos tratamentos com OE de *L. alba* (10 e 20 uL L<sup>-1</sup>), uma vez que não foram verificadas diferenças significativas apenas no tempo 0 h. Em todos os outros tempos, a FV foi significativamente maior no grupo controle e diminuiu em relação aos tratamentos 10 e 20 uL L<sup>-1</sup>. As médias do tratamento 10 uL L<sup>-1</sup> estão dentro do intervalo da média observada por Barreto e Volpato (2004), o que pode indicar redução de estresse. Além disso, no tratamento 20 uL L<sup>-1</sup> ocorreu uma diminuição na FV ao longo do tempo, o que indica que a ação sedativa pode perdurar em até 8 h.

Nos tratamentos com 10 uL L<sup>-1</sup> e 20 uL L<sup>-1</sup> do OE de *L. alba*, a FV no tempo 0 h foi maior do que em todos os outros tempos, sendo que em 10 uL L<sup>-1</sup> do OE de *L. alba* nos tempos 3, 4 e 5 h foi significativamente menor quando comparado aos outros tempos. No tratamento 20 uL L<sup>-1</sup> do OE de *L. alba*, os valores foram significativamente menores a partir de 2 h. Essa diminuição da frequência de acordo com a dose anestésica utilizada pode indicar o tempo de ação do OE de *L. alba*, onde o efeito bradipnéico do anestésico se torna mais evidente na maior concentração. A maioria dos anestésicos em peixes provoca um efeito inibitório no sistema respiratório resultando na diminuição da FV (TONI et al. 2013).

Além da FV, a análise de parâmetros bioquímicos plasmáticos, como glicose, cortisol, atividade de paraoxonase (Figura 1) e lactato, é utilizada na avaliação de estresse durante o transporte, pois são indicativos de alterações fisiológicas relacionadas ao estresse em peixes (OBA et al., 2009).

Figura 1 - Níveis plasmáticos de glicose, cortisol e atividade da paraoxonase em tilápias do Nilo antes e após o transporte (8 h) submetidas ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba*. As letras minúsculas mostram as diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).



No presente estudo, ocorreu aumento significativo dos níveis de glicose plasmática em 10 ul L<sup>-1</sup> de OE de *L. alba* em comparação com os peixes de antes do transporte. Não houve diferença significativa para os demais parâmetros analisados (Figura 1 A). O estresse pode aumentar os níveis de glicose no sangue em resposta à liberação de adrenalina que provoca a glicogenólise muscular e hepática e a consequente liberação de glicose para suprir a demanda dos tecidos em situações de estresse (DIAZ GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

Neste estudo, uma hiperglicemia ocorreu nos peixes transportados na concentração de 10 µl L<sup>-1</sup> do OE de *L. alba* em relação aos peixes de antes do transporte. Isso pode ter ocorrido devido a uma resposta adaptativa ao estresse causado

pelo transporte ou devido a concentração do anestésico utilizada não ser suficiente para reduzir a mobilidade dentro das embalagens, o que possivelmente está correto, uma vez que na concentração mais alta de  $20 \mu\text{l L}^{-1}$ , não ocorreu aumento significativo da glicose plasmática.

Isto pode indicar que nem sempre o uso de anestésico, a depender da concentração, atua na diminuição do uso de energia durante o transporte (TONI et al., 2013). Já o uso de OE de *L. alba* ( $15 \mu\text{l L}^{-1}$ ) em transporte de cavalos marinhos manteve estável os níveis plasmáticos de glicose em relação ao observado com os exemplares antes do transporte, sugerindo que o OE de *L. alba* pode ter inibido esse aumento (CUNHA et al., 2011).

Os níveis de cortisol plasmático se mantiveram sem alterações antes e após o transporte em todos os tratamentos (Figura 1 B). A baixa densidade pode ter contribuído para a estabilidade dos níveis de cortisol, conforme observado em estudo com juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*), onde os níveis de cortisol após o transporte se mostraram menores em baixas densidades ( $5, 10$  e  $15 \text{ g L}^{-1}$ ) (ADAMANTE et al., 2008), além disso alterações nos níveis de cortisol podem ter relação com o tamanho dos peixes (COOK et al., 2012).

A paraoxonase é uma enzima que atua na proteção contra a oxidação de lipoproteínas e está relacionada à resposta imune (CORREIA e PERRY, 2010). Folly et al. (2001) relatam a associação da atividade da paraoxonase a ação antioxidante de lipoproteínas em peixes (*Piaractus Mesopotamicus*) e as relaciona a doenças cardiovasculares. Segundo Bastos et al. (1998 a; b), a paraoxonase é produzida no fígado e sua atividade sérica está intimamente relacionada a função hepática e capacidade de desintoxicação do fígado. No presente estudo, a atividade da paraoxonase não apresentou alterações significativas entre os tratamentos (Figura 1 C), indicando que o estresse do transporte não foi suficiente a ponto de causar alterações hepáticas nos exemplares de tilápia-do-Nilo.

A concentração do lactato plasmático não diferiu significativamente entre os tratamentos, sendo inferior a  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , similar aos parâmetros antes da submissão ao estresse relatado por Welker et al. (2007) para tilápias do Nilo ( $0,41 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Assim verifica-se que tanto no grupo controle, quanto nos grupos submetidos ao uso de OE de *L. alba*, não ocorreu uso de energia anaeróbia, mantendo-se o metabolismo energético dos peixes durante o transporte.

## CONCLUSÃO

A sedação com 20 uL L<sup>-1</sup> de OE de *L. alba* é segura e indicada para o transporte de tilápia-do-Nilo, especialmente por sua atividade na redução da frequência ventilatória, mas também por não causar alterações nos parâmetros bioquímicos plasmáticos ou nos parâmetros físico-químicos da água após 8 h de transporte.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESB pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho e a Bahia Pesca pela doação dos exemplares de tilápia-do-Nilo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMANTE, W.B., NUÑER, A.P.O., BARCELLOS, L.J.G., SOSO, A.B., FINCO, J.A. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.3, p.755-761, 2008.
- ALVARENGA, C.M.D.; VOLPATO, G.L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiol Behavior**, v.57, p.7580, 1995.
- AZAMBUJA, C.R., MATTIAZZI, J., RIFFEL, A.P.K., FINAMOR, I.A., GARCIA, L.O., HELDWEIN, C.G., HEINZMANN, B.M., BALDISSEROTTO, B., PAVANATO, M.A., LLESUY, S.F., Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture** 319 156–161, 2011.
- BARCELLOS LJ, KREUTZ LC, SOUZA CD, RODRIGUESA LB, FIOREZE I, QUEVEDO RM, CERICATO, L, SOSO, AB., FAGUNDES, M., CONRAD, J., LACERDA, LA., TERRA, S., Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**;237:229 e 236, 2004.
- BARRETO, R.E., LUCHIARI, A.C., MARCONDES, A.L. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive Nile tilapia. **Behavioural Processes** 60 235-239, 2003.
- BARRETO RE., VOLPATO GL. Caution for using ventilator frequency as an indicator of stress in fish. **Behav. Process.** 66 43–51, 2004.
- BARRETO RE., VOLPATO GL., Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. **J. Biosci.** 36(5), 851–855, 2011.
- BASTOS, VLF., ROSSINI, A., ALVES, MV., CECCARELLI, PS., LIMA, JAF., BASTOS, JC., Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* valenciennes (Siluridae). **Revta bras. Zool.** 15 (3): 665 - 675, 1998a.
- BASTOS, V.L.F., FOLLY, E., ROSSINI, A., CECCARELLI, P.S., SENHORINI, J.A., BASTOS, J.C., Paraoxonase activity in liver of pacu, *Piaractus Mesopotamicus* Holmberg (Characidae). **Revta bras. Zool.** 15 (5): 677 - 685, 1998b.

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

BIASI, L. A., COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Cienc.Rural**. vol.33, n.3, pp. 455-459. ISSN 0103-8478, 2003.

COOK, K.V.; O'CONNOR, C.M.; MCCONNACHIE, S.H.; COOKE, S.J. Condition dependent intra-individual repeatability of stress-induced cortisol in a freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** v. 161, 3, p. 337-343, 2012.

BRITISH Pharmacopeia. 5<sup>a</sup>. ed. Lodon: The Stationery Office, 2007.

COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and physiological assessment of low concentration of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*) **Aquaculture**, v. 239, p. 509-529, 2004.

CORREIA, J. D., PERRY, I. D. S., Modulação dietética da atividade da paraoxonase: revisão de estudos em humanos. **Rev HCPA** 30(3):271-278, 2010.

COSTAS B, CONCEIÇÃO LEC, ARAGÃO C, MARTOS JA, RUIZ-JARABO I, MANCERA JM, AFONSO, A, Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, 316:68e76, 2011.

CUNHA, M. A., F. M. C. BARROS, L. O. GARCIA, A. P. L. VEECK, B. M. HEINZMANNH, V. L. LORO, T. EMANUELLI & B. BALDISSEROTTO. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**,306:403-406, 2010.

CUNHA, M. A., DA SILVA, B. F., DELUNARDO, F. A. C., BENOVI, S. C., GOMES, L. C., HEINZMANN, B. M. AND BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*, **Neotropical Ichthyology**, 9(3): 683-688, 2011.

DIAZ GONZÁLEZ, F. H., SILVA, S.C., **Introdução a bioquímica veterinária**. Segunda edição. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2006.

FAO 2005 por Rakocy, J. E. Cultured aquatic species information programme. *Oreochromis niloticus*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). V 18, Fevereiro de 2005. Disponível em:

<[www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)>. Acessado em 06 de novembro de 2014.

FIGUEIREDO JR., C.A.; VALENTE JR., A.S. Cultivo de Tilápias no Brasil: Origens e cenário atual. Apresentação oral. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008.

FOLLY, E., BASTOS, V.L.C., ALVES, M.V., BASTOS, J.C., ATELLA, G.C., A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity. **Biochimie** 83 945–951, 2001. MACKNESS B., MACKNESS M.I., ARROL S., TURKIE W., DURRINGTON P. N. (1998) Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 423:57-60.

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

ROUBACH, L; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da aquicultura** (2011) 11 (66): 37- 40.

SANCHES, M.S.S., RODRIGUES, R.A., NUNES, A.L., OLIVEIRA, A.M.S., FANTINI, L.E.; CAMPOS, C.M. (2014) Effect of menthol and eugenol on the physiological responses of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Semina: Ciências Agrárias*, v.35, n.4, p.2799-2808.

SOARES, BV., TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.-Artigo de Revisão. **Biota Amazônica**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

TAVARES, IB., MOMENTÉ, VG., NASCIMENTO, RI., *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos – Revisão literária. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.204–220, 2011.

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; SILVA, L. L.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiol Biochem**, DOI 10.1007/s10695-013-9877-4, Published online, 2013.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; de LIRA, A.D.; de ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

WELKER, T.L., LIM, C., Yildirim-Aksoy, M., KLESIUS, P.H., Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. **Aquaculture** 262 156–162, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração ideal de Eola para anestesia em tilápia do Nilo é de 500 mL L<sup>-1</sup>, embora os efeitos anestésicos sejam perceptíveis numa concentração menor (200 mL L<sup>-1</sup>). A sedação com 20 uL L<sup>-1</sup> de OE de *L. alba* é segura e indicada para o transporte de tilápia-do-Nilo, especialmente por sua atividade na redução da frequência ventilatória.

O uso do Eola é importante na anestesia de peixes, pois possui um efeito anestésico e sedativo desejável e não provoca efeitos residuais tóxicos sendo recomendado para uso em estações de pisciculturas, Além de ser proveniente de uma planta encontrada de todo o Brasil o que a torna acessível aos piscicultores, contribuído positivamente no manejo da produção e para o bem estar dos peixes durante os procedimentos de rotina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Rev. Virtual Quim.** v. 4 n. 2, 146-161. 2012.
- ANSHAU, D. L.; LAZZARI, R.; COSTA, S.T.; DECARLI, J. A.; UCZAY, J.; LOEBENS, L. Produtos anestésicos para juvenis de carpa úngara (*Cyprinus carpio*). **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** Salvador, v.15, n.2, p.406-414 abr./jun., 2014.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, 26, 99-111. 2000.
- BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.D.; RODRIGUESA, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**; 237:229 e 236, 2004.
- BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G.; ZEPPEFELD, HEINZMANN, B.M. & BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiol Biochem**, 38, 789-796. 2012.
- BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaína e eugenol como anestésico para quingio (*Carassius auratus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1597-1602, 2012.
- BORGUETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J.R. Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no Mundo. Curitiba: **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**, 129p. 2003.
- CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; COSTA E SILVA, L. V.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 47, n. 3, jul./sep., 2011.

CHO, G.K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, v.31, p.537- 546, 2000.

CUNHA, M.A.; ZEPPEFELD, C.C.; GARCIA, L.O.; LORO, V. L., FONSECA, M.B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A.P.L.; COPATTI, C.E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, 40: 2107-2114. 2010.

CUNHA, M.A.; DA SILVA, B.F.; DELUNARDO, F.A.C.; BENOVI, S.C.; GOMES, L.C., HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*, **Neotropical Ichthyology**, 9, 683-688. 2011.

EL-SAYED, A.F.M. **Tilápia Culture**. London: Cabi. 277p. 2006.

FAO 2005 por Rakocy, J. E. Cultured aquatic species information programme. *Oreochromis niloticus*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). V 18, Fevereiro de 2005. Disponível em: [www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en). Acessado em 06 de novembro de 2014.

FIDDES, M., Fish anaesthesia in: LONGLEY, L., **Anaesthesia of Exotic Pets**, Saunders Ltd Ed: 1.2008.

FIGUEIREDO JR., C.A.; VALENTE JR., A.S. Cultivo de Tilápias no Brasil: Origens e cenário atual. Apresentação oral. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. FIDDES, M., Fish anaesthesia in: LONGLEY, L., **Anaesthesia of Exotic Pets**, Saunders Ltd Ed: 1.2008.

GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.C.; LOPES, N.P. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. W. Aquac. Soc.*, v.32, p.426-431, 2001.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S. ; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, 33, 5 943-947. 2003.

INOUE, L. A. K. A.; AFONSO, L. O. B.; IWAMA, G. K.; MORAES, G. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazonica**, v.35, p.289-295, 2005.

IWAMA, G.; AFONSO, L.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **J Exp Biol** 204:15–19. 2004.

IWANA, G.; ACKERMAN, A. Anaesthetics. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes. Amsterdam: ELSEVIER Science, v.3, cap. 1, p. 1-15. 1994.

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 & Shellfish Immunology** 34 692-696. 2013.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Rev. bras. Bot.** [online]. vol.26, n.2, pp. 231-238. ISSN 1806-9959. 2003.

MILLEZI A.F.; BAPTISTA N.N.; CAIXETA D.S.; ROSSONI D.F.; CARDOSO M.G.; PICCOLI R.H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.3, p.373-379, 2013.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M., **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Capítulo 8, Embrapa. 2009.

REBELO NETO, P. X. **Piscicultura no Brasil Tropical**. São Paulo: Hemus, 187. 2013.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. 3rd ed, Blackwell Publishing Ltd. 2008.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, L. A. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, 36, 1056-1061, 2005.

ROUBACH, R.; GOMES, L.V. O uso de Anestésico durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v.11, p.37-40, 2001

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 2.ed. London: Blackwell, 1999. 159 p.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 467-95. 2004.

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.

SILVA, T. C.; OLIVEIRA, J. R.; SOUZA, S. J. O. Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. **Revista Crase.edu/Campus Inhumas – Vol. 01 N.01 / 2011**.

SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M.E. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.-Artigo de Revisão. **Biota Amazônica**, 3, 109-123. 2013.

TAVARES, IB.; MOMENTÉ, VG.; NASCIMENTO, RI. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos – Revisão literária. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.204–220, 2011.

TELES, S. Avaliação do teor da composição química das folhas de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. e *Mentha piperita* L. cultivadas em Cruz das Almas, Santo Antônio de Jesus e Amargosa, submetidas as diferentes épocas de colheita em processos de secagem. Cruz das Almas – BA. UFRB, 2010.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; de LIRA, A.D.; de ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nylo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**. v. 10, p. 465-498. 2002.

WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J. Fish Biol.*, v.60. p.340-347, 2002.

WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26, p. 80-81, 1995.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K.; Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture** 295 52–59. 2009.