

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DE TENSOATIVOS NO USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE**  
***Lippia alba* PARA ANESTESIA DE TILAPIA DO NILO (*Oreochromis***  
***niloticus*)**

**LAÍS FRIGINI POSTAY**

**VILA VELHA**  
**AGOSTO/ 2019**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DE TENSOATIVOS NO USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE**  
***Lippia alba* PARA ANESTESIA DE TILAPIA DO NILO (*Oreochromis***  
***niloticus*)**

Dissertação, apresentado à Universidade Vila Velha – UVV, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**LAÍS FRIGINI POSTAY**

**VILA VELHA**

**AGOSTO / 2019**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P857e Postay, Laís Frigini.

Efeito de tensoativos no uso de óleo essencial de Lippia alba para anestesia de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Laís Frigini Postay. – 2019.

56 f.: il.

Orientadora: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Vila Velha, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Células - Testes. 2. Emulsões. 3. Mutações no  
melhoramento genético. 4. Erva-cidreira. I. Gomes, Levy de  
Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 572.8

LAÍS FRIGINI POSTAY

**EFEITO DE TENSOATIVOS NO USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*  
PARA ANESTESIA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

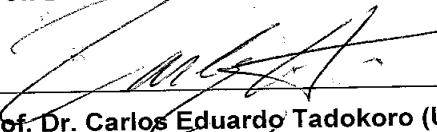
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado (a) em 21 de agosto de 2019,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Tadokoro (UVV)



Prof. Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV)

Orientador

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Levy de Carvalho Gomes por ter acreditado que seria possível, pela generosidade, pelo incentivo e tranquilidade, me orientando com dedicação, à realização deste projeto.

Aos amigos do PPGCF pela parceria e disponibilidade, principalmente, nos horários não tão nobres dos finais de noite e finais de semana. Em especial, aos amigos Karla Heringer, Ana Claudia Hertel e Edgar Kampke, pela troca de experiências e ensinamentos. À amiga de vida, exemplo de carreira acadêmica e profissional, Manuela Cruz, por dividir cada lágrima e sorriso.

Aos colegas biólogos do Laboratório de Ictiologia Aplicada – Labpeixe e à prof. Adriana, que se fizeram amigos, pelo acolhimento, parceria, cumplicidade e amizade. À Dandara Cabral, que com sua garra e disposição incansável, me acompanhou a qualquer hora e me fez persistir até realizar. Ao meu grupinho: Dandara Cabral, Gabriel Coppo e Barbara Christè, por serem verdadeiramente maravilhosos! O carinho e os momentos nunca serão esquecidos. Ao Lauro pela dedicação e disponibilidade nos horários possíveis, nos cuidados com os peixes.

A Tommasi Analítica pelo auxílio com uso do GC-MS;

À minha chefinha Gabrieli Freitas, aos amigos e colegas de trabalho da Secretaria de Saúde Estadual do Espírito Santo – SESA, por me disponibilizarem e me dividirem com a UVV, sempre com carinho e confiando no meu trabalho.

À minha família, por tornarem possível esse grande passo na minha formação, pela paciência e entendimento que a ausência por muitos momentos se fez necessária.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 O uso de óleos essenciais .....	9
1.2 Óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .....	9
1.3 O Uso de óleo essencial em peixes .....	11
1.4 Dispersão de óleo essencial em água .....	13
1.5 Mutagenicidade e genotoxicidade .....	15
1.6 Hipótese .....	16
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivos Gerais .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3. METODOLOGIA .....	18
3.1 Obtenção das amostras .....	18
3.2 Extração do óleo essencial .....	18
3.3 Composição do Óleo Essencial .....	18
3.4 Animais experimentais .....	19
3.5 Desenho experimental .....	19
3.5.1 Teste de estágios de anestesia e margem de segurança em peixes .....	19
3.5.2 Tratamento em camundongos por gavagem .....	22
3.6 Separação de células mononucleares – Lise de hemácias .....	23
3.7 Coleta de células de medula óssea .....	24
3.8 Ensaio do micronúcleo .....	24
3.8.1 Peixes .....	25
3.8.2 Camundongos .....	25
3.9 Ensaio do cometa .....	25
3.10 Análise estatística .....	27
4. RESULTADOS .....	27
4.1 Composição Química por GC-MS .....	28

4.2 <i>Indução de Anestesia (etapa I) e margem de segurança (etapa II)</i> .....	29
4.3 <i>Genotoxicidade</i> .....	31
4.3.1 <i>Peixes</i> .....	31
4.3.2 <i>Camundongos</i> .....	33
5. DISCUSSÃO .....	35
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

## RESUMO

Postay, Laís Frigini, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2019. EFEITO DE TENSOATIVOS NO USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* PARA ANESTESIA EM TILAPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*). Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Os efeitos anestésicos e sedativos do óleo essencial (OE) de *Lippia alba* foram comprovados em peixes, para reduzir o estresse e injúrias do manejo. Entretanto, os OE são imiscíveis em água. Testes de OE de diversas plantas, em anestesia de peixes por inalação, mostram diluições do óleo em álcool, na proporção de 1:10, em que há formação de sistemas heterogêneos de OE na superfície do tanque, dificultando a disponibilidade de compostos na água e a absorção pelos animais. Os tensoativos possuem estrutura molecular apolar e polar, formando emulsões óleo em água (O/A), reduzindo a tensão interfacial entre os líquidos, aumentando a superfície de contato. Nosso objetivo foi avaliar a eficácia do uso de tensoativos na dispersão do OE de *Lippia alba* em anestesia de tilápias, assim como a sua toxicidade em peixes e mamíferos. O OE foi extraído por hidrodestilação e o tempo de anestesia por imersão realizado em exposição por 10 minutos, avaliados em 3 grupos isolados com diferentes tensoativos, polietilenoglicol, polissorbato 20 (Tween® 20) e polissorbato 80 (Tween® 80) e 1 grupo com etanol. Testamos a recuperação e a segurança após exposição por 10, 20 e 30 minutos. Camundongos receberam os mesmos tratamentos por gavagem. Foram colhidas amostras de sangue caudal de peixes e medula óssea e sangue (punção cardíaca) de camundongos, para testes do micronúcleo e cometa. Os compostos majoritários no OE *Lippia alba* foram linalol (42,36%), geraniol (12,46%), neral (10,7%) e limoneno (7,45%). O tempo para atingir os estágios II e IV de anestesia foram mais rápidos nos grupos tratados com T20 ( $60 \pm 2,883$  segundos) e T80 ( $272,090 \pm 20,510$  segundos), respectivamente. O tempo de recuperação em T80 foi mais longo comparado com os grupos, com  $596,66 \pm 47,14$  segundos. Todos os tratamentos apresentaram boa margem de segurança, sem mortalidade. Os efeitos genotóxicos dos tensoativos foram encontrados em mamíferos e peixes de forma similar ao encontrado no grupo testado com álcool. Evidenciamos, portanto, que o uso de tensoativos na piscicultura não trouxe benefícios à toxicidade, tampouco aumento considerável de danos, em relação ao uso habitual com etanol.

**Palavras-chave:** Teste do micronúcleo, teste cometa, emulsão, genotoxicidade, erva cidreira.



## ABSTRACT

Postay, Laís Frigini, M.Sc, University of Vila Velha – ES, march 2019.  
TENSOATIVES EFFECTS IN USE OF ESSENTIAL OIL OF *LIPPIA ALBA* FOR ANESTHESIA IN NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*). Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

The anesthetic and sedative effects of *Lippia alba* essential oil (EO) have been proven in fish to reduce stress and handling injuries. However, EOs are immiscible in water. EO testing of several plants under inhalation fish anesthesia shows 1:10 dilution of oil in alcohol in which heterogeneous EO systems are formed on the surface of the tank, making it difficult for compounds to be available in water and water. absorption by animals. The surfactants have apolar and polar molecular structure, forming oil in water (O / W) emulsions, reducing interfacial tension between liquids, increasing the contact surface. Our objective was to evaluate the effectiveness of surfactant use in *Lippia alba* EO dispersion in tilapia anesthesia, as well as its toxicity in fish and mammals. The EO was extracted by hydrodistillation and the immersion anesthesia time performed in exposure for 10 minutes, evaluated in 3 isolated groups with different surfactants Polysorbate 20 (Tween® 20), Polysorbate 80 (Tween® 80), Polyethylene glycol (PEG) and 1 group with ethanol. We tested recovery and safety after exposure for 10, 20 and 30 minutes. Mice received the same treatments by gavage. We collected fish caudal blood and bone marrow samples and mouse blood (cardiac puncture) for micronucleus testing. The major compounds in the *Lippia alba* EO were linalol (42.36%), geraniol (12.46%), neral (10.7%) and limonene (7.45%). IV anesthesia were faster in the T20 ( $60 \pm 2.883$  seconds) and T80 ( $272.090 \pm 20.510$  seconds) treated groups, respectively, while recovery time at T80 was longer compared to the  $596.66 \pm 47.14$  groups. All treatments showed good safety margin without mortality. The genotoxic effects of surfactants were found in mammals and fish similar to those found in the alcohol-tested group. We evidenced, therefore, that the use of surfactants in psychology did not bring benefits to the toxicity, nor a considerable increase of damages, compared to the usual use with ethanol.

**Keywords:** Micronucleus test, comet test, emulsion, genotoxicity, erva cidreira.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O uso de óleos essenciais

O uso de plantas medicinais para tratamento de variadas doenças e sintomas constitui um recurso alternativo e complementar aos produtos convencionais (GOMES et al., 2011). É uma prática difundida através dos tempos e enraizada culturalmente, principalmente em áreas rurais e indígenas. Em geral, os fitoterápicos apresentam baixo custo e são acessíveis. A medicina popular desperta, impulsiona e embasa vários estudos que podem comprovar cientificamente as propriedades ativas dos produtos naturais utilizados. Uma forte linha de estudos envolve óleos essenciais. Os óleos essenciais são compostos voláteis que pertencem ao metabolismo secundário das plantas, cujos principais componentes são os terpenoides e fenilpropanoides. São misturas complexas de substâncias lipofílicas, com baixo peso molecular, odoríferas e geralmente líquidas (GONÇALVES et al., 2016). Os óleos essenciais e sua grande variedade de compostos, vêm despertando amplo interesse de pesquisa devido à diversidade de atividades biológicas relacionadas a eles, como: antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, larvicida, ovicida, inseticida, sedativa, antioxidante, dentre outras (ROSA et al., 2016; MACHADO, et al., 2014).

### 1.2 Óleo essencial de *Lippia alba*

Extratos e óleos essenciais obtidos a partir de *Lippia* spp. têm sido avaliados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos. Estudos em diversas áreas do conhecimento vêm confirmando tais atividades terapêuticas. O gênero *Lippia* compreende aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídas por regiões tropicais da América, África e Ásia (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). A *Lippia alba*, pertencente à família Verbanaceae, é conhecida por diversos nomes populares, como erva cidreira de campo, erva cidreira arbusto, cidreira brava, alecrim selvagem, alecrim de campo, falsa melissa, erva cidreira brasileira, cidró, cidrão e outros, e é uma espécie que ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil (BIASI e COSTA, 2003). É amplamente empregada na forma de chás, macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos, por suas propriedades antiespasmódica,

antipirética, anti-inflamatória, emenagoga, diaforética, estomáquica, analgésica e sedativa (JULIÃO et al., 2003).

O óleo essencial (OE) de *Lippia alba* é obtido a partir de folhas frescas da planta, através de hidrodestilação. A *Lippia alba* possui 3 quimiotipos identificados, mais frequentes, que apresentam diferenças quanto à composição química, sendo os componentes majoritários o citral, a carvona e o linalol (BIASI e COSTA, 2003). Foi demonstrado que alguns dos quimiotipos apresentam também, diversidade morfológica, especialmente no tamanho, textura das folhas e tamanho e coloração das flores (JULIÃO et al., 2003). Hennebelle et al. (2008), através de análises previamente publicadas, classificou até sete quimiotipos, entre diferentes óleos essenciais de *Lippia alba*, com base na composição e de possíveis caminhos biossintéticos comuns entre eles.

Estudos comprovam os efeitos terapêuticos e atividades biológicas do OE de *Lippia alba*, como por exemplo, a atividade sedativa e anestésica em animais aquáticos (HELDWEIN, et al., 2014; PARODI, et al., 2012), atividade fungicida com inibição do desenvolvimento micelial do fitopatogênico *Alternaria solani* (TOMAZONI et al., 2016) e o acentuado efeito nematicida no controle de larvas de *M. incognita* (GONÇALVES et al., 2016). Foi testado ainda, por Silva et al. (2017), a atividade anti-*Aeromonas hydrophila* e as propriedades anestésicas em peixes dos compostos quirais de linalol (isolado do óleo essencial de *Lippia alba*), resultando na recomendação do uso de ambos os compostos quirais para propósitos sedativos, mas não apropriados para uso antimicrobiano devido à sua alta concentração efetiva.

Autores mostram que os efeitos mutagênicos e genotóxicos do OE de *Lippia alba* não estão bem definidos. Kampke et. al. (2018), ao avaliar o OE de *Lippia alba* em peixes em camundongos, não verificaram efeitos genotóxicos em nenhuma das concentrações testadas. Em um estudo Mesa-Arango et al. (2009), relataram uma atividade citotóxica de citral (componente do óleo essencial de *Lippia alba*) em células HeLa que era comparável com a do pirogalol. Um efeito citotóxico em células epiteliais da lente humana (cristalino) (HLECs) também foi relatado para d-limoneno (um componente principal do quimiotipo II), que, segundo os autores, foi atribuída à inibição

de indução pró apoptótica por ativação de caspases (BAI et al., 2016). Outro estudo, porém, realizado por García et al. (2017), destacou atividade antiproliferativa contra células humanas crônicas de leucemia mielóide (K562), exibida por óleos extraídos do quimiotipo Citral, com a indução de um fenótipo apoptótico e uma boa seletividade. Estudos *in vivo* e *in vitro* apontaram efeito citostático e/ou citotóxico do geraniol (presente no óleo essencial de *Lippia alba*) sobre diversas linhagens tumorais (QUEIROZ et al., 2017).

O amplo uso e a possibilidade de emprego deste óleo nas mais variadas aplicabilidades, torna-o um importante alvo de estudo na área da genética toxicológica, sendo extremamente relevante a avaliação de seu potencial citotóxico, genotóxico e impacto no DNA, a fim de atestar novos anestésicos, neste caso, garantindo a segurança de seu uso em peixes e mamíferos.

### **1.3 O Uso de óleo essencial em peixes**

Devido à riqueza de compostos e atribuições biológicas, além da necessidade de produtos mais seguros e eficazes, as plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas na medicina veterinária e humana, empregando um papel significativo na aquicultura como agentes profiláticos e terapêuticos contra patógenos de peixes, apresentando potencial antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e sedativo (CITARASU et al., 2010). Alternativamente aos fármacos convencionais, foi verificado o uso de plantas medicinais como pesticida de baixa toxicidade e conservante contra peroxidação lipídica em filés de peixes (PARK et al., 2011; SUTILI et al., 2015).

Óleos essenciais e extratos de plantas podem fornecer uma alternativa viável para produtos convencionais na piscicultura, realizando função sedativa e anestésica em peixes, minimizando as perdas econômicas de animais. Esses produtos naturais contêm uma mistura rica de moléculas altamente funcionais e concentradas, podendo apresentar toxicidade. No entanto, no ambiente, esta toxicidade é muito baixa em comparação com a toxicidade de pesticidas ou fármacos sintéticos (PARK et al., 2011). Com o objetivo de evitar resultados indesejáveis de fármacos sintéticos, a utilização de muitos agentes naturais, como “Erva cidreira” (*Lippia alba*), “Alfavaca” (*Ocimum*

*gratissimum*), “Espanta pulga” (*Hesperozygis ringens*), “Cidrão” (*Aloysia triphylla*) e seus óleos essenciais estão sendo sugeridos como alternativas efetivas aos anestésicos sintéticos (GRESSLER et al., 2014; SILVA et al., 2013; TONI et al., 2013).

Anestésicos são importantes na piscicultura para reduzir o estresse, injúrias e a mortalidade no manejo, durante os processos de biometria, transporte, extrusão de gametas e marcação. Vários produtos químicos são usados para anestesia de peixes, sendo os mais comuns a tricaína metanosulfato (MS222), a quinaldina e o 2-fenoxietanol (MGBENKA e EJIOFOR, 1998; ROSS e ROSS, 1999; HOVDA e LINLEY, 2000).

A seleção de um anestésico deve estar relacionada a critérios como a eficácia, o custo, a disponibilidade no mercado, a segurança durante o uso e os possíveis efeitos adversos aos peixes, aos seres humanos e ao meio ambiente (OKAMOTO et al., 2008). O anestésico ideal deve: possibilitar tempo razoável de exposição; anestésiar em até três minutos e a recuperação ocorrer em até cinco minutos; não apresentar toxicidade aos peixes e mamíferos; e ter custo acessível (VIDAL et al., 2008).

O único anestésico químico aprovado pelo FDA para uso em peixes é a tricaína metanosulfato MS222, que não é produzido neste país (BRAZ et al., 2017; TRUSHENSKI et al., 2013; GOMES et al., 2001). Este produto possui o preço bem elevado, sendo a concentração necessária para anestésiar um peixe cerca de dez vezes mais cara que uma concentração similar de benzocaína, por exemplo. Tal situação justifica, portanto, a realização de estudos focados em novas substâncias e procedimentos de anestesia de peixes no Brasil, embasando as autoridades competentes por este tipo de padronização e regulamentação (GOMES et al., 2001).

Os efeitos anestésicos e sedativos do óleo essencial de *Lippia alba*, do quimiotipo Linalol, foram comprovados em peixes jundiás, *Rhamdia quelen*, por muitos autores (CUNHA et al., 2010; HELDWEIN et al., 2014; TONI et al., 2013; SALBEGO et al., 2014). Salbego et al. (2014) comprovou que a adição de Eugenol (proveniente de óleo essencial do cravo) e Linalol (quimiotipo do óleo essencial de erva cidreira) à água do transporte de peixes, melhorou o estado oxidativo do jundiá, como evidenciado

principalmente por níveis mais baixos de peroxidação lipídica medida por ácido tiobarbitúrico (TBARS), em comparação com os controles. Ambos os anestésicos reduziram a atividade cerebral da acetilcolinesterase nas concentrações testadas. Constatou que é aconselhável a adição de Eugenol e óleo essencial de *Lippia alba* à água ao transportar jundiás.

#### 1.4 Dispersão de óleo essencial em água

Os óleos essenciais são imiscíveis em água. Vários estudos mostram, conforme tabela 1, que foram testados os óleos essenciais de diversas plantas, em anestesia de peixes por banho de imersão e inalação, e realizadas diluições prévias do óleo em álcool, geralmente na proporção de 1:10. Ao realizar este procedimento, percebemos que há formação de um sistema heterogêneo, em que o óleo essencial fica na superfície do tanque, o que dificulta disponibilidade de compostos em todo tanque e, conseqüentemente, a absorção pelos animais.

**Tabela 1.** Diluições de diferentes óleos essenciais em etanol em diversos estudos.

Espécie de planta	Princípio Ativo	Espécie	Solvente	Fonte
<i>Lippia alba</i>	Linalol	<i>Oreochromis niloticus</i>	Etanol 1:10	Hohlenwerg er et al. (2016)
<i>Lippia alba</i>	Linalol	<i>Rhamdia quelen</i>	Etanol 1:10	Heldwein et al. (2014)
<i>Aloysia triphylla</i> <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Citral Citral	<i>Rhamdia quelen</i>	Etanol 1:10	Santos et al. (2017)
<i>Aloysia polystachya</i>	Carvona	<i>Epinephelus marginatus</i>	Etanol 1:10	Flogliarine et al. (2017)
<i>Ocimum basilicum</i> <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Linalol Geraniol	<i>Oreochromis niloticus</i>	Etanol 1:10	Limma Netto et al. (2017)
<i>Cunila galioides</i> <i>Origanum majorana</i>	Linalol Terpenol	<i>Rhamdia quelen</i>	Etanol 1:10	Cunha et al. (2017)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol	<i>Oreochromis niloticus</i>	Etanol 1:10	Simões et al. (2011)

<i>Alpinia galanga</i>	Eugenol	<i>Oreochromis niloticus</i>	etanol 1:10	Pikulkaew et al. (2017)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Eugenol	<i>Oreochromis niloticus</i>	etanol 1:20	Adewale et al. (2017)
<i>Nectandra megapotamica</i>	Biciclogermacreno	<i>Centropomus parallelus</i>	etanol 1:10	Tondolo et al. (2013)
<i>Hesperozygis ringens</i> <i>Ocotea acutifolia</i> <i>Lippiasidoides</i>	Pulegona Óxido Cariófileno Carvacrol	<i>Rhamdia quelen</i>	etanol 1:10	Silva et al. (2013)

Os tensoativos apresentam em sua estrutura molecular uma região apolar e outra polar e, levam à formação de emulsões água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A). Portanto, reduzem a tensão interfacial entre os líquidos, diminuindo, assim, a energia necessária para dispersar um líquido no outro, dividindo uma das fases do sistema heterogêneo em pequenos glóbulos, o que resulta em um aumento considerável da superfície de contato e mistura de fases (PRISTA et al., 2002).

De modo geral, os tensoativos de característica não iônica apresentam-se mais seguros e menos tóxicos, quando comparados aos tensoativos aniônicos e catiônicos, e são utilizados em formulações parenterais e orais. Além disso, tensoativos não iônicos conferem maior estabilidade ao sistema, pois são menos sensíveis à adição de eletrólitos ou a variações de pH, e apresentam maior grau de compatibilidade com diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos aniônicos e catiônicos, destacando-se nesta classe os polissorbatos e derivados do polietilenoglicol (WADHWA et al., 2011; BEDIN, 2011; CERPNJAK et al., 2013; FEITOSA, 2015). O polietilenoglicol (PEG) é comumente aplicado em cosmética, farmacêutica, têxtil, tintas, entre outras indústrias e é aprovado pela FDA para uso em produtos de consumo humano e é considerado um composto atóxico, biocompatível e não-imunogênico (An et al. 2009 e Jang et al. 2015). Os polissorbatos são líquidos oleosos derivados de sorbatos PEGilizados esterificados com ácidos graxos para solubilizar os óleos essenciais em produtos à base de água (Schiweck et al. 2012).

### **1.5 Mutagenicidade e genotoxicidade**

Avaliando os ensaios biológicos para programas de bioacompanhamento de indivíduos sob risco carcinogênico e de organismos aquáticos expostos, o teste do micronúcleo (MN) é proposto como um método de avaliação de danos cromossômicos em células expostas a agentes genotóxicos (FENECH et al., 1999). Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e nos genes de reparo do DNA (BONASSI et al., 2007). Esses eventos, que causam a formação do MN, como rearranjos cromossômicos, expressão gênica alterada ou aneuploidia, são efeitos associados com a instabilidade cromossômica geralmente observada no câncer (RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004). Em indivíduos humanos saudáveis, não submetidos à agentes genotóxicos, a frequência de micronúcleos é de 1-3 por 1.000 células nucleadas (CARRARD et al., 2007).

Agentes clastogênicos podem induzir quebras cromossômicas e fragmentos acêntricos que não conseguem migrar para os polos da célula durante a anáfase e podem não ser incluídos nos núcleos das células-filhas após a divisão celular formando, assim, os chamados micronúcleos, observados no citoplasma dos eritrócitos policromáticos (PCE) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Os PCEs, quando sofrem maturação, transformam-se em eritrócitos normocromáticos (NCEs), os quais são lançados na corrente sanguínea. O teste do MN se caracteriza pela observação do efeito do agente testado em PCEs anucleados, que têm vida curta; assim, qualquer micronúcleo encontrado representa dano cromossômico recente (RIBEIRO et al., 2003).

Segundo Suzuki et al., 1989, nos testes do micronúcleo, a diminuição na proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) / eritrócitos normocromáticos (ENC) e um índice mitótico diminuído no ensaio de aberração cromossômica são indicadores de toxicidade da medula óssea induzida por mutagênicos. A relação EPC/ENC é um indicador da aceleração ou inibição de eritropoiese e tem sido reportada para variar com o tempo de maturação e o declínio contínuo na relação EPC/ENC pode ser devido à inibição da divisão celular, morte de eritroblastos, remoção de células danificadas e/ou diluição do conjunto de células existentes com células recentemente formadas (VENKATESH et al., 2007).



O Ensaio do Cometa é mais vantajoso em comparação a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, pois possui sensibilidade para a quantificação de baixos níveis de danos genéticos, facilidade de aplicação, exige um pequeno número de células por amostra, sem necessidade de estarem em proliferação, pequenas quantidades da substância teste, baixos custos e é necessário um período curto de tempo para realização do experimento. (TICE et al., 2000). Se trata de uma técnica da eletroforese celular em microgel, para avaliação de danos e reparos de DNA em células individuais, baseado na lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo e a análise refere-se ao grau de fragmentação do DNA, medidas por comprimento total da “cauda” fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra (BRIANEZI, 2009).

### **1.6 Hipótese**

Nossa hipótese é que o uso de tensoativos e emulsificantes podem contribuir e aumentar a dispersão do óleo essencial de *Lippia alba* na água, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade dos compostos. Assim, menor quantidade do óleo será necessária para realizar a sedação adequada dos peixes, além de não trazerem toxicidade aos animais e aos consumidores destes, os mamíferos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

- Avaliar o uso de tensoativos na dispersão do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown em anestesia de *Oreochromis niloticus*.
- Avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade em peixes e mamíferos expostos ao óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown dispersos com tensoativos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do óleo extraído por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas.
- Avaliar o tempo de anestesia e tempo de recuperação de *Oreochromis niloticus* com óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown disperso com tensoativos.
- Avaliar a margem de segurança em anestesia de *Oreochromis niloticus* com óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown disperso com tensoativos.
- Avaliar a formação de micronúcleos em peixes e mamíferos tratados com o óleo essencial disperso com tensoativos.
- Avaliar o dano de DNA pela formação de cometas em peixes e mamíferos tratados com o óleo essencial disperso com tensoativos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção das amostras

As amostras de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foram obtidas a partir de um cultivo particular na cidade de Vila Velha – ES. Tais amostras já foram devidamente identificadas pela botânica Msc. Solange Zanotti Schneider e armazenada no herbário da Universidade Vila Velha sob o número UVV 2134.

#### 3.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *L. alba* foi obtido empregando-se o método de hidrodestilação com arraste a vapor, utilizando o aparelho de Clevenger conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram empregados aproximadamente 1 kg de folhas frescas e 1000 mL de água, com tempo de extração de duas horas a contar do início da ebulição. Em seguida, o hidrolato foi mantido em repouso e o óleo então separado após o congelamento. A fração do óleo foi recolhida e armazenada em frascos âmbar sob resfriamento, a 4°C e ao abrigo da luz até o momento de uso. Foram realizadas várias extrações de óleo essencial e ao final obtivemos um pool de 17mL. A densidade do óleo essencial obtido foi de 0,89 g/mL.

#### 3.3 Composição do Óleo Essencial

Os constituintes químicos do óleo essencial foram identificados por cromatografia em cromatógrafo gasoso (GC-MS Trace GC 1310) acoplado a ISQ Spectrometrer (Thermo Fisher Scientific - Amostrador automático: Triplus RSH (Thermo Fisher Scientific). As substâncias voláteis foram separadas em uma coluna capilar DB-5ms (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm, J&W Scientific, Folson Califórnia, USA), com temperatura de 60°C, aumentando até 240 °C de forma linear de 3°C/min, permanecendo por 7 min na temperatura final. O gás de arraste utilizado foi o hélio a uma vazão constante de 1 mL/min e temperatura do injetor foi mantida em 230 °C, a temperatura da interface (CG-EM) foi mantida em 240 °C. As amostras foram diluídas em hexano (2 mg/mL) e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor no modo splitless. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura, realizada de 35 a 400 m/z e a tensão do detector foi de

1,6 kV. A identificação dos compostos foi realizada primeiramente pela comparação da similaridade dos espectros de massa obtidos com os da literatura (NIST 2005; ADAMS, 2009), posteriormente pela comparação do Índice Kovats com a literatura (IK) (ADAMS, 2009). Analisou-se a série homóloga de alcanos (C7 - C30) nas mesmas condições cromatográficas e, a partir dos tempos de retenção destes, foram calculados os Índices de Kovats (IK) dos compostos voláteis.

### **3.4 Animais experimentais**

Tilápias (*Oreochromis niloticus*) com aproximadamente 2 meses de idade, procedentes de um criador particular foram transportados para o laboratório de Ecotoxicologia Aquática no complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV onde foram mantidos em caixas de 310L com sistema de filtração e fotoperíodo controlado (12/12h). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração comercial contendo 28% de proteína. Durante este período, a qualidade da água foi monitorada quanto a parâmetros como O<sub>2</sub> dissolvido, temperatura, condutividade, dureza e pH. As características físico-químicas da água utilizada nos ensaios foram as seguintes: pH 7,23 ± 0,09 unidades; temperatura 23,77 ± 0,07°C; condutividade 0,095 ± 0,0025 ms/cm, concentração de oxigênio 7,16 ± 0,30 mg/L. A dureza foi de 105,97 ± 28,81 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Camundongos *Mus musculus* pertencentes à linhagem Balb/c também com aproximadamente 2 meses de idade procedentes do Laboratório de Acompanhamento experimental da Universidade Vila Velha foram utilizados. Os animais foram mantidos em condições padrões de biotério, com ração e água livre e ciclos de luminosidade a cada 12 horas e temperatura em torno de 22°C. Todos os procedimentos estão em conformidade com o estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA – UVV – Parecer nº 513-2018).

### **3.5 Desenho experimental**

#### **3.5.1 Teste de estágios de anestesia e margem de segurança em peixes**

Os tratamentos utilizados foram: um grupo com óleo disperso em álcool e grupos anestesiados com óleo essencial dispersos com 3 diferentes tensoativos,

polietilenoglicol (PEG), polissorbato 20 (Tween® 20 – T20 ) e polissorbato 80 (Tween® 80 – T80). Para solubilizar o óleo essencial foram preparadas soluções individuais imediatamente utilizadas nos aquários para indução anestésica. O grupo tratado com álcool (AL) foi anestesiado com óleo essencial e etanol na proporção 1:10, conforme prática usual. Os grupos tratados com os tensoativos foram preparados com polissorbato 20 (Sigma – Aldrich, Duque de Caxias – Rio de Janeiro – Brasil), polissorbato 80 (Sigma – Aldrich, Duque de Caxias – Rio de Janeiro – Brasil) e polietilenoglicol (Brenntag Quimica, Anápolis – Goiás – Brasil) a 0,1%. A proporção de 0,1% foi obtida a partir de testes de estabilidade da emulsão. Essa foi a menor concentração de tensoativo que promoveu uma estabilidade de no mínimo 1 hora.

De acordo com Hohlenwerger et al. (2016), concentrações acima de 200µL/L de óleo essencial de *Lippia alba* são necessárias para anestesia de tilápias, sendo a concentração ideal em 500µL/L, ambos diluídos em etanol 1:10. Visto que, nossa hipótese é que o uso de tensoativos disponibilize melhor os compostos anestésicos na água, sendo necessária menor concentração do óleo, anestesiámos todos os grupos numa concentração fixa de 250µL/L de óleo essencial de *Lippia alba*. Os protocolos experimentais estão de acordo com Gomes *et al.* (2001) e Façanha e Gomes (2005).

Na primeira etapa dos testes, avaliamos os tempos de anestesia de cada grupo adicionado o respectivo tensoativo (T20, T80 e PEG) e comparados com o grupo com etanol (AL). Cada animal foi usado apenas uma vez e foram observados cada estágio de anestesia, conforme Tabela 2. Os juvenis de tilápia (19,53±2,01 g e 8,22±2,31 cm; n = 11 para cada tratamento) foram anestesiados em aquários individuais de 6L contendo 3L de água. O tempo de exposição foi de 10 minutos. Após a exposição, os peixes foram transferidos para um aquário de recuperação de 30L contendo 25L de água, com ausência de OE, aeração constante. Os animais foram considerados recuperados quando demonstraram natação normal e reação a estímulos externos.

**Tabela 2.** Caracterização dos estágios de anestesia em peixes. Adaptado conforme Ross e Ross (1999); Vidal et al., (2008).

ESTÁGIO	DESCRIÇÃO	RESPOSTA COMPORTAMENTAL
0	Normal	Reativos a estímulos externos, batimentos operculares normais, reação muscular normal
I	Sedação leve	Reativos a estímulos externos, movimentos reduzidos, batimentos operculares mais lentos, equilíbrio normal
II	Sedação profunda	Perda total da reatividade aos estímulos externos, exceto forte pressão, leve queda dos movimentos operculares, reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração
III	Narcole	Perda parcial do tônus muscular, natação errática, aumento dos movimentos operculares, reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração
IV	Anestesia profunda	Perda total de tônus muscular, perda total de equilíbrio, batimento opercular lento, porém regular
V	Anestesia cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo, movimentos operculares lentos, perda total de todos os reflexos
	Recuperação	Recuperação do equilíbrio e retorno da atividade natatória completa

Na segunda etapa dos testes, foram avaliados os efeitos de diferentes tempos de anestesia, tempo de recuperação e mortalidade. Os peixes (n = 6 peixes por grupo) foram anestesiados individualmente em aquários de 6L contendo 3L de água a 250µL/L de óleo essencial de *Lippia alba* disperso em álcool, T20 e T80 por 10, 20 e 30 minutos. Logo após a exposição, os peixes foram para recuperação em um aquário de 30 L com aeração constante. Após a recuperação os peixes foram monitorados por 96 horas para verificar mortalidade.

Na terceira etapa, os peixes (n = 6 peixes por grupo) foram anestesiados individualmente em aquários de 6L contendo 3L de água a 250µL/L de óleo essencial de *Lippia alba* disperso em álcool, T20 e T80 por 10 minutos. Logo após a exposição, os peixes foram para recuperação em um aquário de 30 L com aeração constante, onde permaneceram por 48 horas. Após 48 horas, o sangue foi coletado da veia caudal, com seringa heparinizada. Com as amostras de sangue foram realizadas as

análises de toxicidade (Micronúcleo e Cometa).

### 3.5.2 Tratamento em camundongos por gavagem

O veículo utilizado para solubilizar o óleo essencial foi preparado de forma equivalente ao realizado nos testes de anestesia em peixes. Foram preparadas soluções estoque concentradas do grupo com etanol e dos grupos testes T20 e T80. O controle negativo foi exercido somente por água ultrapura. A solução estoque do grupo com etanol foi preparada a partir de 10 mg do óleo essencial de *L. alba*, adicionados etanol 1:10 e água ultrapura (q.s.p. 1mL). As soluções estoque dos grupos T20 e T80 foram preparadas de forma individuais, cada uma contendo 10 mg do óleo essencial de *L. alba*, seu respectivo tensoativo polissorbato 20 e polissorbato 80 a 0,1%, e água ultrapura (q.s.p 1mL). A partir destas soluções concentradas, diluições foram realizadas, conforme o peso do animal, obtendo o volume final a ser administrado na gavagem, mantendo a dosagem fixa.

A conversão da dose pela área de superfície corporal foi realizada de acordo com as recomendações da Food and Drug Administration (FDA). As doses administradas aos animais seguiram parâmetros como peso e área de superfície corporal (FDA, 2005). As doses foram convertidas seguindo a fórmula:

$$CED \left( \frac{mg}{kg} \right) = Peixe \ dose \left( \frac{mg}{kg} \right) \times \frac{Peixe \ km}{Camundongo \ km}$$

Onde: CED = dose equivalente para camundongos e Km é o fator de conversão de dose sendo calculado pela divisão entre peso (kg) e área de superfície corporal (BSA) (m<sup>2</sup>). Este fator permite converter a dose de mg/kg para mg/m<sup>2</sup> (REAGAN-SHAW, et al.,2007).

O BSA é calculado segundo a fórmula:

$$BSA = \frac{\sqrt{Altura \ (cm) \times \ Peso \ (kg)}}{60}$$

Aplicando os valores médios de peso e comprimentos dos animais obteve-se Km de 2,92 para os peixes enquanto que nos camundongos é igual a 3. Sendo assim, a dose de óleo essencial aplicado aos peixes de 222,5 mg/kg (equivalente a 250 µL/L) foi

convertida para a dose equivalente aos camundongos de aproximadamente 216,5 mg/kg. Esta conversão foi de igual forma aplicada a todos os tratamentos por gavagem na mesma dosagem.

Os camundongos obtidos a partir do Laboratório de Acompanhamento experimental da Universidade Vila Velha ( $29,33 \pm 2,14$  g e  $8,1 \pm 1,64$  cm) foram transferidos para gaiolas com 6 animais cada para ambientação por 10 dias com ciclos de luminosidade de 12 horas, temperatura em torno de 22°C, alimentação e água livres conforme estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA- UVV – Parecer 513-2018).

Nos camundongos, após a ambientação, foi administrada uma única injeção via oral do tratamento teste por gavagem. Foram utilizados 6 animais por grupo (Controle negativo, Álcool, T20 e T80), num total de 24 camundongos. A partir da solução estoque, de acordo com o peso de cada camundongo, foi calculado o volume a ser administrado. Feito isso, com auxílio de uma seringa e uma cânula para gavagem, foram administrados os tratamentos e os animais foram devolvidos imediatamente à gaiola, onde permaneceram em observação. Após o período de 48 horas dessa administração, os camundongos foram anestesiados com Tiopental 20mg/mL e colhidas as amostras de sangue por punção cardíaca e medula óssea no fêmur para as análises de toxicidade do teste de micronúcleo e o ensaio cometa, respectivamente.

### **3.6 Separação de células mononucleares – Lise de hemácias**

A separação das células mononucleares de mamíferos foi realizada por lise de hemácias para realização do ensaio cometa em camundongos. Metodologias com eritrócitos isolados após a centrifugação e leucócitos por gradiente de densidade, podem sofrer alterações celulares inerentes à centrifugação, portanto tipicamente neste processo de lise, os eritrócitos são removidos pela adição de um tampão de lise, preservando as células mononucleares (WEISS, 2002).

A amostra de sangue proveniente da punção cardíaca do camundongo foi homogeneizada e centrifugada a 450 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em 2 mL de solução de lise de hemácias 1x (83,9g de Cloreto de amônio, 10g bicarbonato de potássio, 0,37g de EDTA e água destilada



q.s.p.1000 ml) e as amostras foram misturadas e deixadas 5 minutos a 37°C. Após esse tempo, à reação foram adicionados 4 mL PBS 1x e centrifugado por 5 minutos a 450 g. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com a pipeta e descartado. Ao pellet foi adicionado 2 mL de PBS 1x, homogeneizado e novamente centrifugado a 450 g por 5 minutos. Esse último procedimento foi repetido e, assim, as amostras de células de medula óssea foram utilizadas nas lâminas previamente preparadas para o ensaio cometa.

### ***3.7 Coleta de células de medula óssea***

Para o isolamento das células de medula óssea os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico e submetidos à toracotomia para exposição do coração e demais órgãos. Foi feita incisão na região acima do acetábulo do membro inferior, permitindo a remoção de fêmures e a retirada do músculo e limpeza dos ossos, segundo protocolos de Schmid (1975) e Krishna and Hayashi (2000). Foi feito um corte rente às extremidades epifisárias do fêmur a fim de expor o canal medular e, assim, foi possível realizar o flush utilizando-se uma agulha e seringa com soro fetal bovino. Por meio do flush obteve-se uma suspensão de medula óssea a qual foi homogeneizada e centrifugada a 450 g por 10 minutos. Após, foram preparadas as lâminas para análise de micronúcleos.

### ***3.8 Ensaio do micronúcleo***

Os procedimentos de preparo das lâminas são comuns para peixes e camundongos, diferindo no processo de coloração. O ensaio do micronúcleo com corante fluorescente laranja de acridina foi realizado em amostras sanguíneas dos peixes conforme a técnica descrita por Ueda et al. (1992) e com corante Leishman em medula óssea nos camundongos, conforme descrito por Krishna e Hayashi, (2000). Uma gota ou cerca de 10µL da amostra de células foi aplicada em uma lamina limpa e seca, e espalhada através de um esfregaço. Após a secagem em temperatura ambiente overnight, as lâminas foram fixadas por 10 minutos com metanol, em seguida, lavadas em água corrente e secaram ao ar. Após, foi realizado o protocolo de coloração e análise dos dados.

### **3.8.1 Peixes**

Em peixes, a coloração realizada com laranja de acridina a 0,003 % por 2-3 minutos e, após, realizada a análise microscópica em microscópio de epifluorescência em aumento de 1000x, imediatamente. Cerca de 1000 células foram contabilizadas, sendo os resultados expressos em percentual de micronúcleos encontrados em 1000 células. A leitura de todas as lâminas foi realizada às cegas e por um único avaliador.

### **3.8.2 Camundongos**

Em camundongos, a coloração com Leishman foi realizada por 2 minutos e após, por 14 minutos com Leishman diluído, permitindo a diferença visual entre eritrócitos imaturos policromáticos (EPC) e eritrócitos maduros normocromáticos (ENC). A análise de células foi realizada com a utilização de um microscópio óptico, aumento de 1000x. Para avaliar a mutagenicidade foram analisados 2000 eritrócitos imaturos policromáticos (EPC) por animal e a frequência de micronúcleos destes. Para avaliação da citotoxicidade, foram contados 200 eritrócitos (EPC e ENC) por animal, totalizando 12.000 células por por tratamento, e realizada a relação EPC/ENC para calcular a frequência de EPC (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995). A leitura de todas as lâminas foi realizada às cegas e por um único avaliador.

Como critério de inclusão para a análise consideramos as células com as membranas citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos não excederam mais do que 1/3 do tamanho do núcleo. Um total de 1000 EPCs foram analisados por lâmina. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos individuais foi utilizado como unidade experimental, com variabilidade (desvio padrão) calculada de diferenças entre animais dentro do mesmo grupo.

A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), expressa em porcentagem, foi determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ EPCMN} = (\text{n}^\circ \text{ de EPCMN}) / (\text{n}^\circ \text{ de células analisadas}) \times 100$$

### **3.9 Ensaio do cometa**

O ensaio de cometa alcalino para verificação de danos em DNA foi realizado conforme descrito por Ward and Maples (2000), avaliados na amostra de sangue dos

peixes testados e na amostra de sangue dos camundongos testados após lise de hemácias. Os procedimentos de preparo das lâminas são comuns para peixes e camundongos, diferem apenas na origem e coleta da amostra.

Lâminas microscópicas regulares foram revestidas com uma solução de agarose 1% de ponto de fusão normal (em água destilada, 60°C) e secas por um período mínimo de 24 horas e armazenadas a 4°C até o momento de uso. Após isso, adicionou-se 10µL de células a um microtubo escuro contendo 1000 µL de soro bovino fetal e armazenou-se o microtubo em contato direto com gelo. Para preparo da lâmina, foram adicionados 120µL de uma solução de agarose 0,8% de baixo ponto de fusão (em PBS, a 37°C) e espalhados sobre as lâminas previamente revestidas e cobertas com uma lamínula. Em seguida, as lâminas foram submetidas a gelificação a 4°C durante 20 minutos, quando então as lamínulas foram removidas. Tais lâminas foram, então, submersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5M; EDTA 100mM; Tris 10mM em pH ajustado para 10 com adição de 1% de Triton x – 100 e Lauril) a 4°C por 2 horas. Na sequência, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em água destilada e então colocadas em câmara de eletroforese coberta com uma solução tampão alcalina (NaOH a 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada durante 30 minutos em voltagem de 25 V e amperagem de 300mA. Estes passos foram realizados na ausência de luz a fim de evitar danos adicionais ao DNA. Após esse processo, as lâminas foram lavadas por 3 vezes, com duração de 5 minutos cada lavagem, com um tampão de Tris 0,4M em pH 7,5 para neutralizar o excesso alcalino. Por fim, a coloração por solução de Syber Green® diluída, revestindo as lâminas com 50µL e cobertas com uma lamínula para posterior análise em microscópio de fluorescência.

Durante a observação das lâminas foram contabilizadas 100 células por animal em duplicata e os danos no DNA classificados arbitrariamente de acordo com o tamanho da cauda do cometa. Foram adotadas cinco classes na qual: 0 – ausência de dano com cauda inexistente, até 4 – dano máximo com cauda de cometa longo. O Índice de Dano (ID) nos grupos pode variar de 0 (100 x 0 – 100 células com ausência de dano) a 400 (100 x 4 – 100 células com dano máximo). A pontuação foi avaliada pelo somatório da multiplicação da classe do cometa pelo número de células com estes

danos. A frequência de dano (%) foi calculada usando porcentagem de dano em cada classe. A leitura das lâminas foi realizada às cegas e por um único avaliador.

### **3.10 Análise estatística**

Foram testadas as normalidades dos resíduos utilizando o teste de Shapiro-Wilk e quando necessário os valores foram normalizados, utilizando  $\log_{10}$ . Os diferentes estágios e tempo de recuperação da anestesia foram comparados entre os tratamentos utilizando análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados de toxicidade não apresentaram distribuição normal mesmo depois da transformação e foram analisados por uma Kruskal-Wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no software sigmaplot 12.5.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Composição Química por GC-MS

A identificação de *Lippia alba* por GC-MS (Trace GC 1310 acoplado a ISQ Spectrometrer (Thermo Fisher Scientific - Amostrador automático: Triplus RSH (Thermo Fisher Scientific) apresentou como compostos majoritários o linalol (42,36%), geraniol (12,46%), neral (10,7%) e limoneno (7,45%) conforme observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição do óleo essencial de *Lippia alba* realizada por GC-MS.

Pico	RT	%Area	KI calculado	KI teórico	Composto
<b>10</b>	<b>7.26</b>	<b>7.45</b>	<b>1031</b>	<b>1029</b>	<b>Limoneno</b>
<b>15</b>	<b>9.69</b>	<b>42.36</b>	<b>1100</b>	<b>1096</b>	<b>Linalool</b>
11	7.36	3.89	1035	1031	Cineol <1,8->
13	8.21	3.65	1060	1059	Terpineno < $\gamma$ ->
33	25.08	2.92	1476	1476	Cadina-1(6),4-dieno <trans>
9	7.12	2.46	1027	1026	Cimeno <o->
6	5.91	2.35	985	985	Hepten-2-one <6-metil-5->
<b>24</b>	<b>16.43</b>	<b>12.46</b>	<b>1269</b>	<b>1267</b>	<b>Geraniol</b>
<b>22</b>	<b>15.17</b>	<b>10.7</b>	<b>1239</b>	<b>1238</b>	<b>Neral</b>
4	5.64	1.46	975	975	Sabineno
12	7.8	1.27	1048	1050	Ocimeno <(E)- $\beta$ ->
30	22.57	1.11	1414	1419	Cariofileno <(E)->
7	6.05	0.93	989	990	Mirceno
21	13.99	0.71	1208		não identificado
38	28.09	0.71	1552	1561	Germacreno B
20	13.7	0.62	1201		não identificado
18	12.81	0.57	1181	1180	Isocitral <(E)->
5	5.78	0.48	980	979	Octen-3-ol <1->
2	4.52	0.4	928	930	Thujeno < $\alpha$ ->
17	12.06	0.4	1163	1164	Isocitral <(Z)->
34	26.1	0.38	1500	1509	Germacreno A
16	11.7	0.33	1154	1153	Citronelol
23	15.38	0.31	1244	1243	Carvona
14	8.63	0.29	1072	1070	Sabinene hydrate <cis-> (IPP vs. OH>
1	3.22	0.24	854	853	Hexenol <(3E)->
19	13.41	0.24	1194	1188	Terpineol < $\alpha$ ->

37	27.8	0.18	1545	1458	Hedycaryol
8	6.88	0.16	1019	1017	Terpineno< $\alpha$ ->
39	32.41	0.15	1666	1671	Bulnesol
35	26.48	0.14	1510	1515	Cubebol
3	4.71	0.13	937	939	Pineno < $\alpha$ ->
27	21.34	0.11	1384	1388	Cubebeno < $\beta$ ->
25	20.82	0.1	1373	1375	Ylangene < $\alpha$ ->
32	24.03	0.08	1451	1454	Humuleno < $\alpha$ ->
28	21.43	0.07	1386		não identificado
31	23.02	0.07	1425	1432	Copaeno < $\beta$ ->
36	26.6	0.07	1513	1523	Cadineno < $\delta$ ->
26	21.1	0.03	1379	1381	Geranil acetato
29	22.02	0.03	1399		não identificado
		100,00			TOTAL

#### **4.2 Indução de Anestesia (etapa I) e margem de segurança (etapa II)**

Durante os testes de indução de anestesia por 10 minutos, em todos os tratamentos, os peixes apresentaram reação de hiperatividade ao primeiro contato com o anestésico, evidenciada por movimentos rápidos no aquário, que diminuiu à medida que o efeito do anestésico se instalava. No total de 11 peixes testados em cada grupo, 6 peixes do grupo com álcool e 5 peixes do grupo tratado com PEG, não atingiram o estágio de anestesia IV (anestesia profunda).

Os resultados sobre os tempos (segundos) dos estágios de indução a anestesia podem ser observados na Tabela 4. Avaliando os tempos de anestesia em cada estágio por tratamento, os estágios I e III não apresentaram diferenças entre os grupos. No estágio II, houve diferença significativa no grupo tratado com T20, comparado com os demais grupos e o grupo com álcool, atingindo esse estágio de forma mais rápida. No estágio IV, houve diferença significativa com o grupo tratado com T80, comparado com os demais grupos, diminuindo o tempo para atingir esse estágio.

**Tabela 4.** Tempo (segundos) dos estágios de indução a anestesia em tilápias, expostos à óleo de *Lippia alba* na concentração de 250 $\mu$ L/L com diferentes tensoativos: polissorbato 20, polissorbato 80 e polietilenoglicol. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P<0,05).

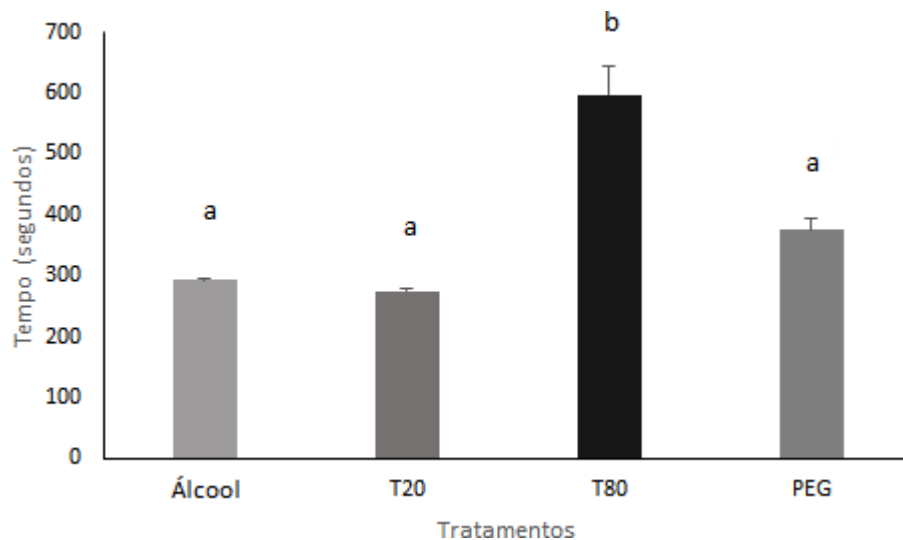
Estágios de anestesia adaptado conforme Ross e Ross (1999); Vidal et al., (2008).

TRATAMENTO	ESTAGIO 1	ESTAGIO 2	ESTAGIO 3	ESTAGIO 4
Álcool	25,181 ± 1,237 <sup>a</sup>	107,909 ± 7,198 <sup>a</sup>	250 ± 27,565 <sup>a</sup>	372,666 ± 50,081 <sup>a*</sup>
Tween 20	20 ± 1,832 <sup>a</sup>	60 ± 2,883 <sup>b</sup>	148,272 ± 8,814 <sup>a</sup>	334,181 ± 41,358 <sup>a</sup>
Tween 80	22,818 ± 0,977 <sup>a</sup>	65,909 ± 3,306 <sup>a</sup>	145 ± 7,355 <sup>a</sup>	272,090 ± 20,510 <sup>b</sup>
Polietilenglicol	30 ± 2,232 <sup>a</sup>	67 ± 4,428 <sup>a</sup>	198,636 ± 14,822 <sup>a</sup>	365 ± 61,353 <sup>a**</sup>

\* de 11 animais, 5 não atingiram o estágio IV.

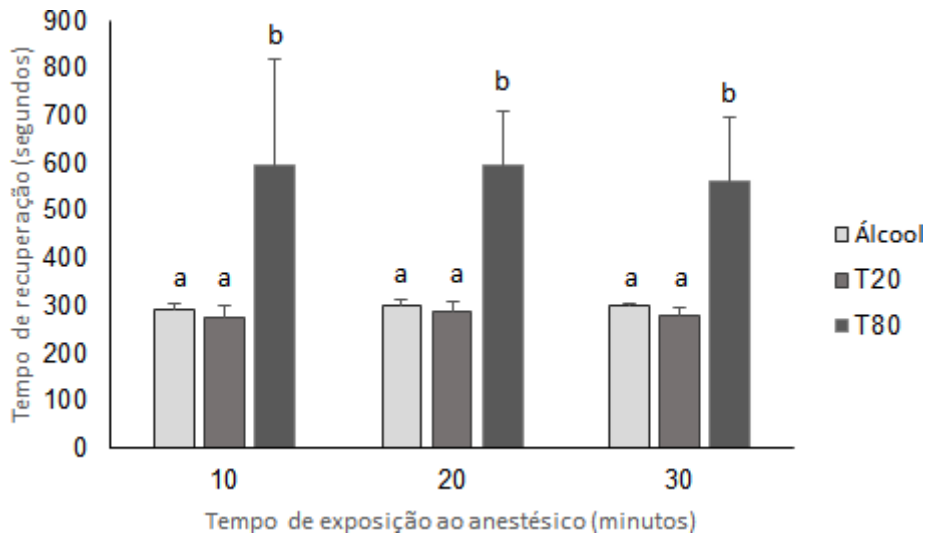
\*\* de 11 animais, 6 não atingiram o estágio IV

Quanto à recuperação, o grupo controle apresentou média de 293,5 ± 2,43 segundos, o grupo com tensoativo T20 teve tempo de recuperação média de 274,83 ± 4,55 segundos, o grupo com tensoativo T80 foi média de 596,66 ± 47,14 segundos e o grupo com PEG apresentou tempo de recuperação média de 375 ± 18,87 segundos. No grupo tratado com T80, houve diferença significativa, comparado com os outros grupos, com um tempo de recuperação mais prolongado (Figura 1).



**Figura 1** – Tempo de recuperação (segundos) da anestesia de tilápias por 10 minutos utilizando *Lippia alba* na concentração de 250µL/L com diferentes tensoativos: grupo de anestésico disperso em álcool, polissorbato 20 (T20), polissorbato 80 (T80) e polietilenoglicol (PEG). Letras diferentes indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na etapa II, avaliou-se o efeito de duração da anestesia e margem de segurança. Os tempos de recuperação se mantiveram semelhantes à etapa I em todos os tempos de exposição e estão relatados na Figura 2. Não houveram mortalidades após período de observação de 96 horas.



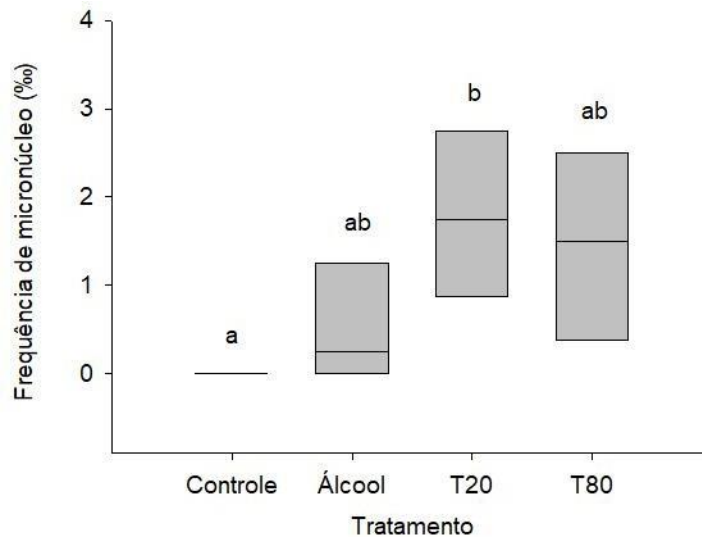
**Figura 2** – Tempo de recuperação (em segundos) após anestesia de tilápias utilizando *Lippia alba* na concentração de 250µL/L com diferentes tensoativos: grupo de anestésico disperso em álcool, polissorbato 20 (T20) e polissorbato 80 (T80), com exposição com duração de 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos. Letras diferentes para cada tempo de exposição indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Genotoxicidade

#### 4.3.1 Peixes

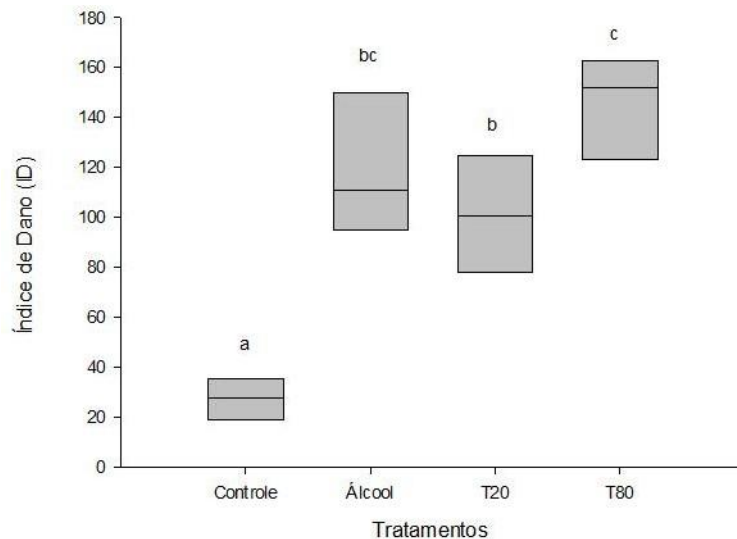
O ensaio do micronúcleo demonstrou diferença significativa apenas entre o grupo tratado com T20 em relação ao grupo controle. O grupo controle não apresentou formação de micronúcleos, enquanto que no grupo tratado com álcool a mediana foi 0,250‰, para o grupo tratado com T20 foi 1,750‰ e para o T80 foi 1,500‰. (Figura 3).





**Figura 3.** Frequência de micronúcleos (‰) em eritrócitos de Peixes expostos à óleo de *Lippia alba* por banho de imersão, na concentração de 250µL/L com diferentes tensoativos: controle negativo, grupo de anestésico disperso em álcool, polissorbato 20 (T20) e polissorbato 80 (T80). Os dados foram expressos em mediana de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

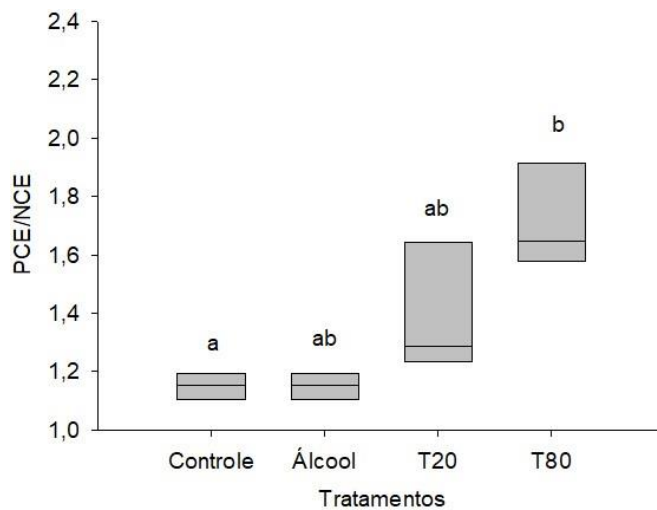
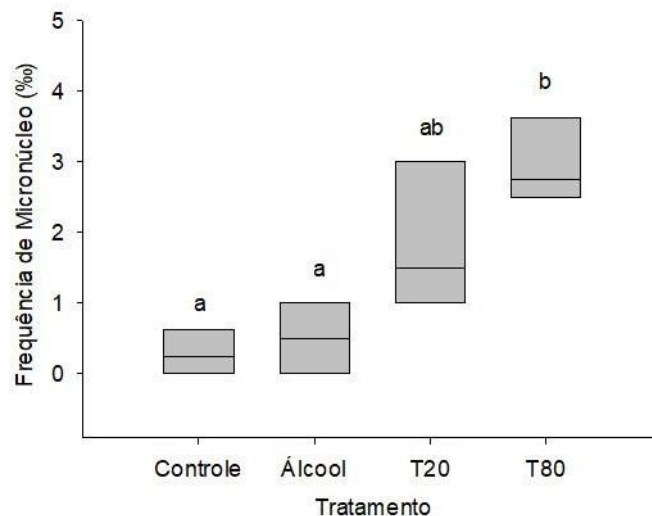
O índice de dano (ID), resultante do ensaio cometa, apresentados nos grupos tratados com T20 e T80 tiveram diferença significativa entre si e quando comparados com o grupo controle, mas quando comparados ao grupo com etanol não apresentaram diferenças significativas (Figura 4).



**Figura 4.** Índice de danos em ensaio cometa de Peixes expostos à óleo de *Lippia alba* por banho de imersão, na concentração de 250 $\mu$ L/L com diferentes tensoativos: grupo de anestésico disperso em álcool, polissorbato 20 (T20) e polissorbato 80 (T80). Os dados foram expressos em mediana de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

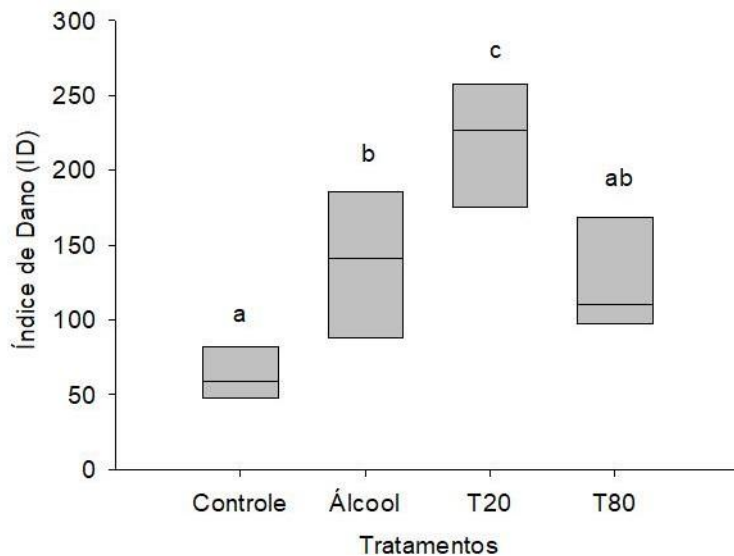
#### 4.3.2 Camundongos

Para análise de mutagenicidade, os resultados do ensaio de micronúcleo na medula óssea pela frequência de micronúcleos encontrados em 1000 células e a estimativa de citotoxicidade pelo cálculo da frequência de EPC e ENC em 200 células observadas na lâmina foram expostos na Figura 5. Houve diferença significativa entre o grupo tratado com tensoativo T80 comparado com o grupo controle e com o grupo tratado com etanol na frequência de micronúcleos encontrados. Quanto à relação EPC/ENC, houve diferença significativa entre o grupo tratado com o tensoativo T20 comparado com o grupo controle.



**Figura 5.** A - Frequência de micronúcleos (%) e B - Relação de eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) EPC/ENC. Amostras de medula óssea de camundongos expostos à óleo de *Lippia alba* por gavagem, na concentração de 250 $\mu$ L/L com diferentes tensoativos: controle negativo, grupo de anestésico disperso em álcool, polissorbato 20 (T20) e polissorbato 80 (T80). Os dados foram expressos em mediana de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O índice de dano (ID), resultante do ensaio cometa em camundongos, apresentados nos grupos tratados com álcool e com tensoativo T20 tiveram diferença significativa entre si e quando comparados com o controle (Figura 6).



**Figura 6.** Índice de danos em ensaio cometa de camundongos expostos à óleo de *Lippia alba* por gavagem, na concentração de 250 $\mu$ L/L com diferentes tensoativos: controle negativo, grupo de anestésico disperso em álcool, T20 e T80. Os dados foram expressos em mediana de 6 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

### **5.1 Composição do óleo essencial de *Lippia alba***

Vários autores relataram variações químicas na composição de óleo essenciais e atividades biológicas, em amplas variações geográficas, para o óleo essencial de *Lippia alba*. Jannuzzi et al. (2010) com análise de cromatografia gasosa em óleo essencial de vários genótipos do centro-oeste brasileiro, definiram a existência de cinco compostos majoritários: linalol (89,8%), citral (neral e geranial) (56,7%), mirceno (47,6%), carvona (46,9%) e limoneno (36%). Fatos semelhantes foram evidenciados por Heldwein (2011) e Kampke et al. (2017) que relataram como compostos majoritários no óleo essencial de *Lippia alba* o linalol, apresentando aproximadamente 53% e 47%, respectivamente. Neste estudo obtivemos como compostos majoritários o linalol (42,36%), geraniol (12,46%), neral (10,7%) e limoneno (7,45%), corroborando com a diversidade na composição apresentada por outros autores, sendo compostos majoritários semelhantes aos citados.

### **5.2 Dispersão de óleo essencial em água**

A diluição habitual do óleo essencial com etanol 1:10, para ajudar na emulsificação, pode ser prejudicial para organismos na água, reduzindo o crescimento e aumentando a mortalidade do coral ramificado, *Pocillopora verrucosa*, segundo Mulochau & Durville (2004). Outros autores como Frisch et al. (2007), relataram que o uso da mistura de etanol e óleo de cravo (eugenol) em corais *in vitro* causou branqueamento e mortalidade tecidual em colônias de *Pocillopora damicornis*. Outras pesquisas revelam que o solvente etanol é susceptível de aumentar o branqueamento de corais, mas não perturba a taxa de crescimento, em comparação com o óleo de cravo dissolvido na água do mar (BOYER et al., 2009).

Os óleos essenciais possuem a característica de serem imiscíveis em água, portanto são menos biodisponíveis. Segundo Kanani et al. (2018), aplicando sistemas com soluções heterogêneas, transparentes e estáveis, a solubilidade de óleos essenciais aumenta, o que, conseqüentemente, aumenta a eficiência anestésica. Os autores mostraram ainda que as emulsões de óleo de cravo e de limão têm efeito anestésico significativo em peixe beluga (*Huso huso*) e podem induzir a anestesia muito mais rapidamente do que o MS-222, através deste tipo de formulação. Kheawfu et al.

(2017) evidenciou ainda que, os peixes avançaram nos estágios de anestesia com a formulação de emulsão do óleo essencial de cravo (eugenol) com polissorbatos (nanoemulsão), significativamente mais rápido do que com a mistura óleo e etanol. Além disso, também tiveram tempo de recuperação da anestesia significativamente menor do que aqueles anestesiados com óleo e etanol, conforme também ocorreu no presente trabalho.

Emulsões, como a que realizamos neste trabalho, mostram instabilidade física, como agregação de gotículas de óleo internas ou separação de fases após o armazenamento por um período de tempo (KHEAWFU et al. 2017). Entretanto, nos testes que utilizamos, as formulações eram utilizadas imediatamente após o preparo e o tempo máximo de exposição à mistura de óleo, água e tensoativos, não ultrapassaram 30 minutos, não sendo necessária uma estabilidade prolongada. Existem muitos tipos de surfactantes ou tensoativos e os tipos não iônicos, como os polissorbatos, são os mais populares para preparações farmacêuticas, devido à sua compatibilidade com vários compostos ativos (MILAN, 2007). Grande parte dos autores, avaliaram o uso de óleos essenciais na anestesia de peixes de várias espécies em soluções etanólicas. O presente estudo mostrou que a formação de emulsão de óleo de *lippia alba* acelera a indução anestésica comparado com a solução etanólica, obtivemos indução mais rápida de anestesia de peixe, inferindo que houve aumento da miscibilidade do óleo na água no processo de anestesia por imersão.

### **5.3 Teste de estágios de anestesia e margem de segurança em peixes**

Autores como Vidal et al. (2007), Hohlenwerger et al. (2016) e Silva et al. (2012) relataram um aumento na atividade de peixes (natação) no primeiro momento de exposição à anestesia, esse fato também foi observado neste trabalho em todos os tratamentos. Hohlenwerger et al. (2016) destacou ainda que, o óleo essencial de *Lippia alba* não foi tão eficaz em tilápias, como citados em outras espécies (Becker et al., 2012; Heldwein, 2012), não ocorrendo anestesia em concentrações inferiores a 200µL/L, apenas sedação. Neste presente estudo, o óleo essencial de *Lippia alba* na concentração de 250µL/L diluído com tensoativos T20 e T80, foi eficiente para anestésias tilápias, atingindo todos os estágios de anestesia.

Quanto ao grupo tratado com PEG, alguns animais não atingiram o estágio final de anestesia, semelhante ao que ocorreu com o grupo com etanol. Segundo Laranjeira (2016) o polietilenoglicol desempenha o papel de co-polímero, que atua como agente auxiliar de emulsões e de dispersões sólidas, como no encapsulamento em que protege as partículas de óleos essenciais. Prista et al. (1992) dispõe sobre a formação de emulsões mais estáveis formadas com combinação de tensoativos lipofílico e hidrofílico, visto que cada tipo de emulsificante se adsorverá fortemente à fase correspondente promovendo uma ligação interfacial coesa, ainda que seja possível formar emulsão com um único tensoativo. Wadhwa et al. (2011) destacam que um número limitado de tensoativos pode ser usado para formulação de sistemas auto-emulsionantes, entre eles os tensoativos não-iônicos como polissorbatos e derivados de polietilenoglicol, de modo que hidrofiliicidade é a característica desejável para formulação O/A e rápida dispersão do óleo em meio aquoso. Neste trabalho, verificamos que o uso isolado de PEG não contribuiu para melhor disponibilizar o óleo essencial, comparado com os polissorbatos que são mais hidrofílicos, e teve tempo de indução anestésica semelhante ao grupo anestesiado com etanol.

Comparando os óleos essenciais com anestésicos sintéticos, Gressler et al. (2012) mostra que o tempo de anestesia de jundiás com metanosulfonato de tricaína MS222 (anestésico sintético) é muito maior que o tempo realizado pelo óleo essencial de cravo (eugenol). Evidencia ainda que, juntamente com outros autores como Cunha et al. (2010), que a atividade anestésica é concentração-dependente, ou seja, à medida que se aumenta a concentração do óleo essencial, há diminuição do tempo necessário para o avanço dos estágios na indução anestésica. Outros autores também relataram a relação concentração-dependente de óleos essenciais. Simões et al. (2011) observaram que somente a concentração de 80 mg/L de óleo de cravo não induziu as tilápias a todos os estágios de anestesia, mas com aumento da concentração avançaram nos estágios de anestesia total. Neste trabalho, a concentração fixa de óleo essencial de *Lippia alba* (250µL/L) em adição de tensoativos, mostrou que não é apenas o aumento da concentração capaz de diminuir o tempo de indução anestésica. O aumento da disponibilidade do óleo essencial, através de partículas menores de óleo

essencial, formadas pelo sistema emulsionado, otimiza o processo de indução anestésica, comparada com diluição com etanol (1:10).

Ross e Ross (1999) e Roubach e Gomes (2001) acreditam que 10 minutos deve ser o tempo máximo de anestesia. Para os tempos de recuperação, segundo Marking & Meyer (1985), o limite da faixa considerada crítica de recuperação é menor que 10 minutos e a faixa ideal menor que 5 minutos..Souza-Silva et al. (2015) que utilizou eugenol para anestesia de Oscar (*Astronotus ocellatus*), verificaram que ocorreu grande variação nos tempos de recuperação, não havendo redução no coeficiente de variação dos tempos de recuperação à medida em que a dose é aumentada. De forma diferente, Simões et al. (2011), mostraram que após a exposição, a 250mg/L de mentol, a tilápia nilótica apresenta tempo de recuperação dos peixes expostos por 10 minutos significativamente menor que os expostos por 20 e 30 minutos. Além disso, o mentol não apresentou margem de segurança, devido a mortalidade de 20 e 10% dos peixes expostos por 20 e 30 minutos, respectivamente. Evidenciamos no presente estudo que, mesmo sem variação na concentração e com períodos de exposição diferentes (10, 20 e 30 minutos), tivemos tempos de recuperação semelhantes, com apenas um grupo testado apresentando diferença significativa e tempo de recuperação elevado, o grupo tratado com T80 (próximo a 10 minutos). Entretanto, não houveram mortalidades em nenhum dos grupos expostos a nenhum dos tempos analisados, demonstrando boa margem de segurança.

#### **5.4 Mutagenicidade e Citotoxicidade**

Historicamente, a escolha do veículo das formulações em estudos pré-clínicos é realizada por escolha pessoal ou por prática usual e informações adequadas quanto ao uso, aplicação e segurança não estão disponíveis com facilidade na literatura (GAD et al., 2016). Eskandani et al. (2013) em análise a provável citotoxicidade e genotoxicidade de T20 na linhagem celular de carcinoma epitelial de pulmão humano e células endoteliais de veias umbilicais humanas concluíram que o T20 inibe o crescimento de linhas celulares normais e de câncer por indução de apoptose via cromatina e fragmentação de DNA. Quando administrados T20 intravenoso foi observada em cães hipersensibilidade (ESCHALIER et al., 1988) e foi associada a uma



reação depressora prolongada (KRANTZ et al., 1951). Esta resposta hipotensora foi causada por uma libertação acentuada de histamina após ingestão de PS80 em cães (ELDER, 1984;). Thackaberry et al. (2010) confirmaram a adequação de uso de altas doses de T80 via oral para camundongos e ratos, e estabeleceram que não há efeitos biológicos significativos, também via oral, em cães e primatas não humanos ao longo de 3 meses de tratamento.

Segundo Bernardes (2015), os eritrócitos policromáticos (EPL), na medula, são células em estágio imaturo de desenvolvimento e que sofrem maturação se transformando em eritrócitos normocromáticos (ENC), os quais serão lançados no sangue na proporção de EPC/ENC de 1:1, em organismos saudáveis, significando que a produção desse tipo celular está em equilíbrio. Em situações de dano celular/citotóxico, a proporção de EPC diminui, refletindo numa diminuição na relação EPC/ENC. Por ainda apresentarem resquícios de material genético em seu interior, os EPC costumam corar em um tom azulado/roxo com corantes como Leishman, diferenciando o EPC em coloração roxa e o ENC em coloração mais rosada.

Maistro et al. (2010), ao analisar a toxicidade do óleo essencial de alecrim *R. officinalis* em roedores, mostrou que no teste do cometa, três doses diferentes de óleo de alecrim induziram danos consideráveis no DNA e que houve aumento significativo nos micronúcleos. Entretanto, os resultados da razão entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos mostraram que uma única dose de óleo de alecrim não afetou negativamente a hematopoiese. Queiroz et al. (2017) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade no composto geraniol (encontrado no OE de *lippia alba*), em células mononucleares de sangue periférico (efeitos diretos) e células de hepatocarcinoma (após metabolização de enzimas pelo fígado) obtendo resultados por ensaio cometa que mostraram que nenhuma das concentrações causaram um aumento significativo no número de células danificadas, não apresentando genotoxicidade nem mutagenicidade, em concentrações até 100 µg/mL. No presente estudo, em camundongos, a frequência de micronúcleos encontrados foi maior nos animais do grupo tratado com tensoativo T80 quando comparados com o grupo controle e grupo tratado com etanol. Quanto à relação EPC/ENC houve diferença entre o tratamento com T20 e controle, evidenciando alteração na hematopoiese. O ensaio cometa em camundongos confirmou a

genotoxicidade, apresentando diferença estatística no grupo tratado com T20 comparado com os outros tratamentos (T80 e álcool), além de todos (álcool, T20 e T80) apresentarem diferença em relação ao grupo controle, concluindo que foi tóxico aos mamíferos.

Kampke et al. (2017) avaliaram o efeito genotóxico do óleo essencial de *Lippia alba* em peixes e camundongos e não apresentaram características mutagênicas em nenhuma dosagem. Nossos resultados mostram, que em peixes, tivemos diferença significativa na frequência de micronúcleos no grupo tratado com T20 comparado com os demais grupos, e no ensaio cometa os tratamentos (T20 e T80) apresentaram diferença estatística entre si e quando comparados com o grupo tratado com etanol foram semelhantes, entretanto todos os tratamentos (álcool, T20 e T80) apresentaram diferença estatística quando comparados com o controle, apresentando indícios de toxicidade.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho ficou evidenciado que os tensoativos T20 e T80 adicionados ao óleo essencial de *Lippia alba* aceleram a indução anestésica em tilápias, atingindo os estágios de anestesia de forma mais rápida quando comparados com grupo tratado com etanol (1:10). Ainda que o uso do tensoativo T80 aumentou o tempo de recuperação, não sendo considerado ideal para um anestésico, os testes apresentaram boa margem de segurança e tolerância, visto que não houveram mortalidades em nenhum dos tratamentos em tempo máximo de exposição de 30 minutos. Os efeitos genotóxicos dos tensoativos foram encontrados em mamíferos e peixes de forma similar ao encontrado no grupo testado com álcool. Evidenciamos, portanto, que o uso de tensoativos na piscicultura não trouxe benefícios à toxicidade, tampouco aumento considerável de danos, em relação ao uso habitual com etanol.

## 7. REFERÊNCIAS

ADEWALE, A. Y., ADESHINA, I., YUSUF, O. Y., Anaesthetic Effect of *Ocimum gratissimum* Extract on *Oreochromis niloticus* Juveniles. **European Journal of Experimental Biology**. v. 7, n. 2, 2017.

AFFONSO, S., Efeitos tóxicos sobre a imunidade intata do peixe *centropomus parallelus* (POEY, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): Avaliação por citometria de fluxo. 2006. 117 f. Tese - Curso de Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Patologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALMEIDA, I. V., DOMINGUES, G., SOARES, L. C., DUSMAN, E., VICENTINI, V. E. P., Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of the benzodiazepine flunitrazepam *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of pharmaceutical sciences**. v. 50, n. 2, 2014.

AN, S. Y., BUI, M. P. N., NAM, Y. J., HAN, K. N., LI, C. A., CHOO, J., LEE, E. K., KATOH, S., KUMADAC, Y., SEONG, G. H., Preparation of monodisperse and size-controlled poly(ethylene glycol) hydrogel nanoparticles using liposome templates. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 331, 2009.

BAI, J., ZHENG, Y., WANG, G., LIU, P., Protective Effect of D-Limonene against Oxidative stress-induced cell damage in Human Lens Epithelial Cells via the p38 pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, 2016.

BALDISSEROTTO, B., BARATA, L. E. S., SILVA, A. S., LOBATO, W. F. F., SILVA, L. L., TONI, C., SILVA, L. V. F., Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. **Neotropical Ichthyology**. v. 16, n. 1, 2018.

BASTO, S. R. L., FERREIRA-SILVA, J. C., SILVA, F. L. A., ALEIXO, G. A. S., STAMFORD, T. C. M., SILVA, M. V., CORREIA, M. T. S., Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário. **Revista de medicina veterinária da UFRPE**. v. 10, n. 1-4, 2016.

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

BEDIN, A., Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação in vitro. 2011. 110 f. Dissertação – Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Toledo. 2011.

BENTO, P. C. N., Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas. 2009. 124 f. Dissertação – Universidade Federal de Rio Grande do Norte, Natal. 2009.

BERNARDES, F. P., Avaliação dos efeitos do tratamento com sildenafil sobre células de medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos. 2015. 89 f. Dissertação – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2015.

BIASI, L. A., COSTA, G., Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**. v. 33 n. 3, 2003.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA**. Vol 1 e 2, 2010.

BRAZ, R. S., SILVA, I. O., TESSER, M. B., SAMPAIO, L. A., RODRIGUES, R. V., Benzocaína, MS-222, eugenol e mentol como anestésicos para juvenis de tainha *Mugil liza*. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**. v. 43, n. 4, 2017.

BRIANEZI, G., CAMARGO, J. L. V., MIOT, H.A., Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V.45, n. 4, 2009.

BOLOGNESI, C., PERRONE, E., ROGGIERI, P., PAMPANIN, D. M., SCIUTTO, A., Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic toxicology**. v. 78S, 2006.

BOYER, S. E., WHITE, J. S., STIER, A. C., OSENBURG, C. W., Effects of the fish anesthetic, clove oil (eugenol), on coral health and growth. **Journal of experimental marine biology and ecology**. v. 369, 2009.

CARRAD, V. C., COSTA, C. H., FERREIRA, L. A., LAUXEN, I. S., RADOS, P. V., Teste dos Micronucleos – um biomarcador do dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de odontologia de Porto Alegre**. v. 48, n. 1/3, 2007.

CERPNIJAK, K., ZVONAR, A., GASPERLIN, M., VRECER, F., Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Acta Pharmaceutica**. v. 63, 2013.

CITARASU, T., Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**. V. 18, n. 3, 2010.

CUNHA, J. A., SCHEEREN, C. A., SALBEGO, J., GRESSLER, L. T., MADALOZ, L. M., BANDEIRA-JUNIOR, G., BIANCHINI, A. E., PINHEIRO, C. G., BORDIGNON, S. A. L., HEIZMANN, B. M., BALDISSEROTTO, B., Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. **Neotropical Ichthyology**. v. 15, n. 1, 2017.

CUNHA, M. A., Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como anestésico para peixes. 2011. 75 f. Tese – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011.

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**. v. 306, 2010.

DELARMELINA, J.M., BATITUCCI, M. C. P., GONÇALVES, J. L. O., Efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da tintura de *Matricaria chamomilla* L. *in vivo*. **Revista Cubana de plantas medicinales**. v. 17, n. 2, 2012.

ELDER, R. L., Final report on the safety assessment of polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85. **International Journal Toxicology**. v. 3, 1984.

ESCHALIER, A., LAVARENNE, J., BURTIN, C., RENOUX, M., CHAPUY, E., RODRIGUEZ, M., Study of histamine release induced by acute administration of antitumor agents in dogs. **Cancer Chemoter Pharmacol.** v. 21, 1988.

ESKANDANI, M., HAMISHEHKAR, H., DOLATABADI, J. E. N., Cyto/Genotoxicity Study of Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20). **DNA and Cell Biology.** v. 32, n. 9, 2013.

FACANHA, M. F., GOMES, L. C., A eficácia do mentol como anestésico para tabaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica.** v. 35, n. 1, 2005.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, U.S. **Food and Drug Administration**, Rockville, Maryland, USA; 30pp. 2002.

FEITOSA, L. Desenvolvimento de sistema autonanoemulsificante de Ibuprofeno e avaliação do perfil de liberação in vitro. 2015. 96 f. Dissertação – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2015.

FENECH, M, HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S., The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis.** V. 428, 1999,

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

FREIRE, M. M., SANTOS, V. G., GINUINO, I. S. F., ARIAS, A. F., L., Biomarcadores na saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasileira.** v. 12, n. 3, 2008.

FRISCH, A. J., ULSTRUP, K. E., HOBBS, J-P. A., The effects of clove oil on coral: an experimental evaluation using *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). **Journal of experimental marine biology and ecology.** v. 345, 2007.

GAD, S. C., SPAINHOUR, C. B., SHOEMAKE, C., PALLMAN, D. R. S., STRICKER-KRONGRAD, A., DOWNING, P. A., SEALS, R. E., EAGLE, L. A., POLHAMUS, K., DALY, J., Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species with Notes on Methods to Improve Utility. **International Journal of Toxicology**. v. 1, n. 84, 2016.

GARCÍA, L. T., LEAL, A. F., MORENO, E. M., STASHENKO, E. E., ARTEAGA, H. J., Differential anti-proliferative effect on K562 leukemia cells of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils produced under diverse growing, collection and extraction conditions. **Industrial Crops and Products**. v. 96, 2017.

GARCÍA-MEDINA, S., RAZO-ESTRADA, A.C., GALAR-MARTINEZ, M., CORTÉZ-BARBERENA, E., GÓMEZ-OLIVÁN, L.M., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I., MADRIGAL-BUJADAR, E., Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, 2011.

GRESSLER, L.T., RIFFEL, A. P. K., PARODI, T. V., SACCOL, E. M. H., KOAKOSKI, G., COSTA, S. T., PAVANATO, M. A., HEINZMANN, B. M., CARON, B., SCHMIDT, D., LLESUY, S. F., BARCELLOS, L. J. G., BALDISSEROTO, B., Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**. v. 45, n. 6, 2012.

GOLLAPUDI, B. B., MCFADDEN, M. G., Sample size for de estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research letters**. v. 347, 1995.

GOMES, L.C., CHIPPARI-GOMES, A.R., LOPES, N.P., ROUBACH, R., ARAUJO-LIMA, C.A.R., Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**. V. 32, n. 4, 2001.

GOMES, S. V. F., NOGUEIRA, P. C. L., MORAES, V. R. S., Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**. v. 36, n. 1, 2011.

GONCALVES, F. J. T., BARBOSA, F. G., LIMA, J. S., COUTINHO, I. B. L., OLIVEIRA, F. C., ROCHA, R. R., NETO, M. A., Atividade antagonista do óleo essencial de *Lippia*



*alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 18, n. 1, 2016.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., GRESSIER, B., JOSEPH, H., BAILLEUL, F., Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**. v. 22, n. 2, 2008.

HOHLENWERGER, J. C., COPATTIA, C. E., SENA, A. C., COUTO, R. D., BALDISSEROTTO, B., HEINZMANND, B. M., CARON, B. O., SCHMIDTE, D., Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? **Marine and Freshwater Behaviour and Pysiology**. 2016.

HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., FENECH, M., The micronucleus assay in human buccal cells as a tool of for biomonitoring DNA damage: The human project prespective on current status and knowledge gaps. **Mutation research**. 2008.

HOVDA, J., LINLEY, T.J., The potential application of hypothermia for anesthesia in adult pacific salmon. **North American Journal Aquaculture**. v. 62, n. 1, 2000.

HWANG, E.S., KIM, G.H., Safety evaluation of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil by assessing micronucleus abnormalities, mutagenicity, and chromosomal aberration. **Food Research International**. v. 47, n. 2, 2012.

HELDWEIN, C. G., Isolamento do principal constituinte ativo do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. brown com potencial anestésico geral e estudo de mecanismo de ação. 2011. 110 f. Dissertação - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2011.

HELDWEIN, C. G., SILVA, L. L., GAI, E. Z., ROMAN, C., PARODI, T. V., BURGER, M. E., BALDISSEROTTO, B., FLORES, E. M. M., HEINZMANN, B. M., S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. v. 41, 2014.

JANG, H. J., SHIN, C. Y., KIM, K. B., Safety Evaluation of Polyethylene Glycol (PEG) Compounds for Cosmetic Use. **Toxicology**. v. 31, 2015.

JANNUZI, H., MATTOS, J. K. A., SILVA, D. B., GRACINDO, L. A. M., VIEIRA, R. F., Avaliação agrônômica e química de dezesseis genótipos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] – quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, 2011.

JORGETTO, G. V., BORIOLO, M. F. G., SILVA, L. M., NOGUEIRA, D. A., JOSE, T. D. S., RIBEIRO, G. E., OLIVEIRA, N. M.S., FIORINI, J. E., Ensaios de atividade antimicrobiana in vitro e mutagênica in vivo com extrato de *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe). **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 70, n. 1, 2011.

JULIÃO, L. S., TAVARES, E. S., LAGE, C. L. S., LEITÃO, S. G., Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 13, 2003.

KAMPKE, E. H., BARROSO, M. E. S., MARQUES, F. M., FRONZA, M., SCHERER, R., LEMOS, M. F., CAMPAGNARO, B. P., GOMES, L. C., Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 59. 2018.

KANANI, H. G., HOUSHMAND, P., HARSIJ, M., ALAMDARI, E. G., Applying new formulated herbal anesthetic comparing to tricaine methanesulfonate (MS-222) in beluga (*Huso huso*). **Iranian Journal of aquatic animal health**. v. 4, n. 1, 2018.

KHEAWFU, K., PIKULKAEW, S., CHAISRI, W., OKONOGI, S., Nanoemulsion: A suitable nanodelivery system of clove oil for anesthetizing Nile tilapia. **Drug Discoveries e Therapeutics**. v. 11, nº 4, 2017.

KIRSCH-VOLDERS, M., PLAS, G., ELHAJOUJI, A., LUKAMOWICZ, M., GONZALEZ, L., LOOCK, K. V., DECORDER, I., The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives Toxicology**. v. 85, 2011.

KRANTZ, J. C., CULVER, P. J., CARR, C. J., and JONES, C. M., Sugar Alcohols XXVIII. Toxicologic, pharmacodynamic and clinical observations on Tween 80. **Bull. Univ. Maryland School Med**. v. 36, 1951.

KRISHNA, G., HAYASHIB, M., *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation research**. v. 455, 2000.

LARANJEIRA, S. F., Nanoencapsulamento de óleo essencial de *Rosemarinus officinalis* com PEG. 2016. 67 f. Dissertação – Universidade da Beira Interior, Covilhã. 2016.

LEE, V. H. L, Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, 2004.

LIMMA NETTO, J. D., OLIVEIRA, R. S. M., COPPATI, C. E., Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogum flexuosus* in the sedation and anaesthesia of Nile tilapia juveniles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2017.

MACHADO, T. F., NOGUEIRA, N. A. P., PEREIRA, R. C. A., SOUSA, C. T., BATISTA, V. C. V, The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 2, 2014.

MAISTRO, E. L., MOTA, S. F., LIMA, E. B., BERNARDES., B. M., GOULART, F. C., Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and molecular research**. v. 9, n. 4, 2010.

MESA-ARANGO, A. C., MONTIEL-RAMOS, J., ZAPATA, B., DURAN, C., BETANCUR-GALVIS, L., STASHENKO, E., Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 6, 2009.

MGBENKA, B.O., EJIOFOR, E.N.. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 8, n. 4, 1998.

MILAN, A. L.K., MILÃO, D., SOUTO, A. A., CORTE, T. W. F., Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 43, n. 4, 2007.

MULOCHAU, T. DURVILLE, P., Effects of a clove oil-ethanol solution on the coral *Pocillopora verrucosa*. **Revue d' Ecologie La Terre et la Vie**. v. 59, 2004.

NUNES, J. C., MELOA, P. T. S., AOUADA, F. A., MOURA, M. R., Influência da nanoemulsão de óleo essencial de limão em filmes à base de gelatina. **Química Nova**. v. 41, n. 9, 2018.

OKAMOTO, M. H., TESSER, M. B., LOUZADA, L. R., SANTOS, R. A., SAMPAIO, L. A., Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. **Ciência Rural**. v. 39, n. 3, 2009.

PARRA, A. V., RUIZ, A. R., GONZALEZ, A. V., MICHELENA, M. V., BADEL, J. B., Estudio genotóxico *in vitro* e *in vivo* en tinturas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Mentha piperita* L. (toranjil de menta). **Revista Cubana de plantas medicinales**. v. 2, n. 1, 1997,

PARK, H. M., KIM, J., CHANG, K. S., KIM, B. S., YANG, Y. J., KIM, G. H., SHIN, S. C., PARK, I. L., Larvicidal activity of myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**. v. 48, n. 2, 2011.

PARODI, T. V., CUNHA, M. A., HELDWEIN, C. G., SOUZA, M., MARTINS, A. C., GARCIA, L. O., JUNIOR, W. W., MONSERRAT, J. M., SCMIDT, D., CARON, 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: Toxicology & Pharmacology**. v. 155, n. 3, 2012.

PIKULKAEW, S., KHUMPIRAPANG, N., CHAISRI, W., OKONOGI, S., Effects of *Alpinia galanga* oil on anesthesia and stress reduction in *Oreochromis niloticus* Surachai. **Drugs Discoveries and Therapeutics**. v. 11, n. 4, 2017.

PRISTA, L.N, ALVES, A.C. MORGADO, R. LOBO, JM. Tecnologia Farmacêutica 6ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian v. 1, 2002.

PRISTA, L.N, ALVES, A.C. MORGADO, R. LOBO, JM. Técnica Farmacêutica e Galênica 4ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian v. 1, 1992.

QUEIROZ, T. B., SANTOS, G. F., VENTURA, S. C., HIRUMA-LIMA, C. A., GAIVÃO, I. O. M., MAISTRO, E. L., Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood

mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). **Genetics and molecular research.** v. 16, 2017.

RAJAGOPALAN, H., LENGAUER, C., Aneuploidy and câncer. **Nature publishing group.** V. 432, 2004.

REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal.**, v.22, n.3, 2007.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K., Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental.** 2003.

ROSA, C.S., VERAS, K. S., SILVA, P. R., NETO, J. J. L., CARDOSO, H. L. M., ALVES, L. P. L., BRITO, M. C. A., AMARAL, F. M. M., MAIA, J. G. S., MONTEIRO, O. S., MORAES, D. F. C., Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista brasileira de plantas medicinais.** v. 18, n. 1, 2016.

ROSS, L.G., Ross, B. 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Third ed. Blackwell Science, Oxford.

ROUBACH, R., GOMES, L. C., VAL, A.L., Safest level of tricaine methanesulfonate (MSS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica.** v. 31, n. 1, 2001.

SALBEGO, J., TONI, C., BECKER, A. G., ZEPPENFELD, C. C., MENEZES, C. C., LORO, V. L., HEINZMANN, B. M., BALDISSEROTO, B., Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Brazilian Journal of Biology.** v. 77, n. 4, 2017.

SANTOS, A. C., JUNIOR, G. B., ZAGO, D. C., ZEPPENFELD, C. C., SILVAY, D. T., HEINZMANN, B. M., BALDISSEROTO, B., CUNHA, M. A., Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia.** v. 44, 2017

SANTOS, G. R., BRUM, R. B. C. S., CASTRO, H. G., GONÇALVES, C. G., FIDELIS, R. R., Effect of essential oils of medicinal plants on leaf blotch in Tanzania grass. **Revista de Ciências Agrônomas**. v. 44, n. 3, 2013.

SCHIWECK, H., BAR, A., VOGEL, R., SCHWARZ, E., KUNZ, M., DUSAUTOIS, C., CLEMENT, A., LEFRANC, C., LUSSEM, B., MOSER, M., PETERS, S., Sugar Alcohols. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 2012.

SCHMID, W., The micronucleus test. **Mutation Research/environmental Mutagenesis And Related Subjects**. v. 31, n. 1, 1975.

SILVA, L. L., BALCONI, L. S., GRESSLER, L. T., GARLET, Q. I., SUTILI, F. J., VARGAS, A. P. C., BALDISSEROTTO, B., MOREL, A. F., HEINZMANN, B. M., S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-Aeromonas hydrophila activity and anesthetic properties in fish. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 89, n. 1, 2017.

SILVA, L. L., SILVA, D. T., GARLET, Q. I., CUNHA, M. A., MALMANN, C. A., BALDISSEROTTO, B., LONGHI, S. J., PEREIRA, A. N. S., HEINZMANN, B. M., Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**. v. 11, n. 2, 2013.

SILVA, A. C. C., BARBOSA, F. G., MAFEZOLI, J., OLIVEIRA, M. C. F., OLIVEIRA, T. F., Hs-spme as an efficient tool for discriminating chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**. v. 40, n. 1, 2017.

SIMOES, L. M., LOMBARDI, D. C., GOMIDE, A. T. M., GOMES, L. C., Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. **Zoologia (Curitiba)**. v. 28, n. 3, 2011.

SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, n. 1, 1988.

SOARES, B.V, TAVARES-DIAS, M., Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**. v. 3, n. 1, 2013.

SOUZA, C. F., LIMA, T., BALDISSERA, M. D., GEIHS, M. A., MACIEL, F. E., NERY, L. E. M., SANTOS, R. C. V., RAFFIN, R. P., HEINZMANN, B. M., CARON, B. O., BALDISSEROTTO, B., Nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil exerts anesthetic effects in the brachyuran crab using *Neohelice granulata* **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v. 90, n. 3, 2018.

SOUZA-SILVA, J. G., ANDRADE, D. R., VIDAL, M. V., FARIAS, W. M., VALERIO, J. F., MENDONÇA, P. P., Eugenol como anestésico para oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de zootecnia.** v. 64, n. 247, 2015.

SOUZA, C. F., BALDISSERA, M. D., SALBEGO, J., LOPES, J. M., VAUCHER, R. A., MOURÃO, R. H. V., CARON, B. O., HEINZMANN, B. M., SILVA, L. V. F., BALDISSEROTTO, B., Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotropical ichthyology.** v. 15, n. 1, 2017.

SUTILI, F. J., CUNHA, M. A., ZIECH, R. E., KREWER, C. C., ZEPPENFELD, C. C., HELDWEIN, C. G., GRESSLER, L. T., HEINZMANN, B. M., VARGAS, A. C., BALDISSEROTTO, B., *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonassp.* **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v. 87, n. 1, 2015.

SUZUKI, Y., NAGAE, Y., LI, J., SAKABA, H., MOZAWA, K., TAKAHASHI, A., SHIMIZU, H., The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). **Mutagenesis.** v. 4, n. 6, 1989.

TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. C., SASAKI, Y. F., Single cell gel/comet assay: Guidelines for In vitro na In vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** v. 35, 2000.

THACKABERRY, E.A., KOPYTEK, S., SHERRATT, P., TROUBA, K., MCINTYRE, B., Comprehensive Investigation of Hydroxypropyl Methylcellulose, Propylene Glycol, Polysorbate 80, and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin for use in General Toxicology Studies. **Toxicological Sciences.** v. 117, n. 2, 2010.

TOMAZONI, E. Z., PANSERA, M. R., PAULETTI, G. F., MOURA, S., RIBEIRO, R. T. S., SCHWAMBACH, J., In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 88, n. 2, 2016.

TONDOLO, J. S. M., AMARAL, L. P., SIMÕES, L. N., GARLET, Q. I., SCHINDLER, B., OLIVEIRA, T. M., SILVA, B. F., GOMES, L. C., BALDISSEROTO, B., MALLMANN, C. A., HEINZMANN, B. M., Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**. v. 11, n. 3, 2013.

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 Physiology biochemistry**. 2013.

TONINI, C.L., CAMPAGNARO, B.P., LOURO, L.P.S., PEREIRA, T.M.C., VASQUEZ, E.C., MEYRELLES, S.S, Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 2, 2013.

TRUSHENSKI, J. T., BOWKER, J. D., COOKE, S. J., ERDAHL, D., BELL, T., MACMILLAN, J. R., YANONG, R. P., HILL, J. E., FABRIZIO, M. C., GARVEY, J. E., SHARON, S., Issues Regarding the Use of Sedatives in Fisheries and the Need for Immediate-Release Options. **Transactions of the American Fisheries Society**. v. 142, 2013.

VIDAL, L. V. O., ALBINATI, R. C. B., ALBINATI, A. C. L., LIRA, A. D., ALMEIDA, T. R., SANTOS, G. B., Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 43, n. 8, 2008.

WARD, T. H., MARPLES, B., SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. **International Journal of Radiation biology**. v. 76, n. 1, 2000.

WADHWA, J., NAIR, A., KUMRIA, R., Self-emulsifying therapeutic system: a potential approach for delivery of lipophilic drugs. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**. v. 47, n. 3, 2011.



WEBER, R. A., PELETEIRO, J. B., MARTIN, L. O. G., ALDEGUNDE, M., The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anesthetic agentes in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup1858). **Aquaculture**. v. 288, 2009.

WEISS, D. J., Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary clinical pathology**. v. 31, n. 2, 2002.