

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

**MITIGANDO A TOXICIDADE DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA
DURANTE A ANESTESIA DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

ALLINY MAGALHÃES BONA

VILA VELHA
OUTUBRO / 2021

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

**MITIGANDO A TOXICIDADE DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA
DURANTE A ANESTESIA DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

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

ALLINY MAGALHÃES BONA

VILA VELHA
OUTUBRO / 2021

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B697m Bona, Alliny Magalhães

Mitigando a toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia durante a anestesia em tilápias (*Oreochromis niloticus*) / Alliny Magalhaes Bona – 2021.

65 f. : il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2021.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Estresse oxidativo.
3. Enzimas. 4. Anestésicos. I. Gomes, Levy de Carvalho.
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

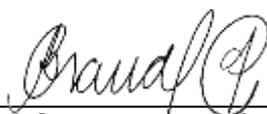
ALLINY MAGALHÃES BONA

**MITIGANDO A TOXICIDADE DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA
DURANTE A ANESTESIA DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

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

Aprovada em 28 de outubro de 2021,

Banca Examinadora:



Prof.(a) Dr.(a) Bianca Prandi Campagnaro (UVV - Universidade Vila Velha)



Prof. Dr. Ernani Pinto Junior (USP - Universidade de São Paulo)



**Prof. Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV - Universidade Vila Velha)
Orientador**

AGRADECIMENTOS

À Deus toda minha gratidão, por ter me dado forças para chegar até aqui, mesmo com tantos obstáculos enfrentados e superados.

Aos meus pais, José e Fernanda, minha irmã, Vitória, e familiares que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, sempre me apoiando, incentivando e me dando esperanças, sou totalmente grata à vocês.

Agradeço também à todos os professores que me acompanharam durante este trajeto, em especial ao professor Levy, responsável pela realização deste trabalho, por ter me orientado e por toda tranquilidade e sabedoria que me proporcionou. À professora Bianca que faz parte da banca pela segunda vez, sempre com ótimas contribuições. E ao professor Ernani por também fazer parte da banca e por me incentivar a dar o meu melhor.

Aos amigos e colegas do laboratório, pelo incentivo e pela ajuda constante. Obrigada de verdade, vocês não imaginam o quanto me ajudaram diretamente ou indiretamente nessa jornada.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - Catalase

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FBS - Soro bovino fetal

GST - Glutathione S-transferase

GPx - Glutathione peroxidase

ID - Índice de danos

MN - Teste de micronúcleo

NCBI - National Center for Biotechnology Information

RT-qPCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

SOD - Superóxido dismutase

SRA - Sequence Read Archive

SNC - Sistema nervoso central

DESCRIÇÃO FINANCIAMENTO

Esse projeto tem apoio financeiro da FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo), sob o programa CAPES-FAPEMIG-FAPES-CNPq-ANA - Bacia do Rio Doce.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	10
2. HIPÓTESE	12
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
4.1 Aquicultura	13
4.2 Tilápia	14
4.3 Manejo dos animais	14
4.4 Anestesia com produtos convencionais	16
4.5 Óleos essenciais como anestésicos	17
4.6 Toxicidade.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Desenho experimental	24
<i>Experimento 1: anestesia com os óleos essenciais individuais.....</i>	<i>24</i>
5.2 Análise comportamental.....	26
5.3 Análise de genotoxicidade	27
5.3.1 <i>Ensaio Cometa</i>	27
5.3.2 <i>Teste de Micronúcleo.....</i>	28
5.4 Análise enzimática do estresse oxidativo.....	28
5.4.1 <i>Preparo do homogenato de fígado</i>	28
5.4.2 <i>Proteína total</i>	28
5.4.3 <i>Catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6)</i>	29
5.4.4 <i>Glutathione S-transferase (GST; E.C. 2.5.1.18)</i>	29
5.4.5 <i>Superóxido dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1)</i>	29
5.5 Análise molecular	30
5.5.1 <i>Extração do RNA</i>	30
5.5.2 <i>Quantificação da expressão gênica</i>	30

5.6 Análise estatística	30
6. RESULTADOS	32
<i>Experimento 1: anestesia com os óleos essenciais individuais.....</i>	<i>32</i>
6.1 Análise comportamental.....	32
6.2 Análises de genotoxicidade	34
6.3 Análise da atividade de enzimas antioxidantes.....	34
6.4 Análise molecular.....	36
<i>Experimento 2: anestesia com os óleos essenciais combinados.....</i>	<i>37</i>
6.5 Análise comportamental.....	37
6.6 Análise de genotoxicidade	40
6.7 Análise da atividade de enzimas antioxidantes.....	40
6.8 Análise molecular.....	42
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

BONA, Alliny Magalhães, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, outubro de 2021. **Mitigando a toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia durante a anestesia em tilápias (*Oreochromis niloticus*).** Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Os anestésicos sintéticos ou à base de plantas são utilizados na aquicultura para facilitar o manuseio dos peixes. Os anestésicos naturais são potencialmente mais favoráveis ao ambiente, mais rentáveis e mais seguros do que as drogas sintéticas para a gestão e o bem-estar dos organismos aquáticos. O óleo de cravo-da-índia se destaca na aquicultura devido a sua função anestésica, porém estudos mostram que quando administrado em uma concentração elevada é tóxico. Desta maneira, esse estudo avaliou o uso isolado e combinado dos óleos essenciais do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), da melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) como anestésicos para a tilápia (*Oreochromis niloticus*). Foi determinada a eficácia dos anestésicos a partir do tempo de indução e recuperação e do potencial tóxico (genotoxicidade e estresse oxidativo). O estresse oxidativo foi determinado utilizando os marcadores enzimáticos superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) e a expressão gênica dessas mesmas enzimas. A genotoxicidade foi avaliada a partir do teste de micronúcleo e ensaio cometa. O óleo de cravo em 200 µL/L foi o óleo que causou anestesia mais rápida (em 6,5 min), porém apresentou genotoxicidade. Apenas o óleo de melaleuca em 450 µL/L não alterou a atividade da enzima GST, os outros tratamentos apresentaram uma inibição dessa enzima. Já CAT e a SOD não foram alteradas. O óleo de canela 75 e 100 µL/L induziu a expressão gênica de *cat*, enquanto os óleos de cravo (150 e 200 µL/L) e melaleuca (450 µL/L) foram capazes de inibir a expressão gênica de *sod*. Assim, foi testada a combinação dos óleos de canela (100 µL/L) e melaleuca (500 µL/L), nas proporções de 10 e 25%, com o de cravo-da-índia (150 µL/L), e verificou-se que não apresentou genotoxicidade aos peixes e todos atingiram o último estágio da anestesia. Contudo, a combinação dos óleos de cravo e melaleuca 125 µL/L apresentou uma diminuição da atividade CAT e GST, os tratamentos com cravo e canela 25 µL/L e cravo e melaleuca 50 µL/L também obtiveram uma diminuição da GST. O óleo do cravo 200 µL/L apresentou um aumento da atividade da SOD e diminuição na expressão gênica de *cat*, assim como o óleo de cravo e canela 25 µL/L e cravo e melaleuca 50 e 125 µL/L. Ambos os tratamentos com cravo e melaleuca 50 e 125 µL/L e cravo e canela 25 µL/L diminuíram a expressão gênica de *gst*. Apenas o o óleo de cravo e canela 10 µL/L aumentou a expressão do gene *sod*. Pode-se concluir que os óleos sofreram um desequilíbrio nas análises enzimáticas ou uma desregulação na expressão dos genes enzimáticos em relação ao controle, entretanto recomendá-se o uso dos óleos combinados de cravo-da-índia (150 µL/L) e melaleuca (50 µL/L), pois é eficaz como anestésico, o índice de mortalidade foi nulo e não apresentou genotoxicidade.

Palavras-chave: genotoxicidade, enzimas de estresse oxidativo, expressão gênica, canela, melaleuca.

ABSTRACT

BONA, Alliny Magalhães, M.Sc., Vila Velha University - ES, October 2021.
Mitigating the toxicity of clove essential oil during anesthesia in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Advisor: Levy de Carvalho Gomes.

Synthetic or plant-based anesthetics are used in aquaculture to facilitate the handling of fish. Natural anesthetics are potentially more environmentally friendly, more cost-effective, and safer than synthetic drugs for the management and welfare of aquatic organisms. Clove oil is prominent in aquaculture due to its anesthetic function, however studies show that when administered in a high concentration it is toxic. Thus, this study evaluated the isolated and combined use of the essential oils of clove (*Eugenia caryophyllata*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as anesthetics for tilapia (*Oreochromis niloticus*). The efficacy of the anesthetics was determined from the induction and recovery time and the toxic potential (genotoxicity and oxidative stress). Oxidative stress was determined using the enzyme markers superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) and the gene expression of these enzymes. Genotoxicity was assessed from micronucleus test and comet assay. Clove oil at 200 µL/L was the oil that caused anesthesia fastest (in 6.5 min), but showed genotoxicity. Only melaleuca oil at 450 µL/L did not alter the activity of the GST enzyme, the other treatments showed an inhibition of this enzyme. CAT and SOD were not altered. Cinnamon oil 75 and 100 µL/L induced cat gene expression, while clove (150 and 200 µL/L) and melaleuca (450 µL/L) oils were able to inhibit sod gene expression. Therefore, the combination of cinnamon (100 µL/L) and melaleuca (500 µL/L) oils, in the proportions of 10 and 25%, with clove (150 µL/L) was tested and found to show no genotoxicity to the fish and all reached the last stage of anesthesia. However, the combination of clove and melaleuca oils 125 µL/L showed a decrease in CAT and GST activity, the treatments with clove and cinnamon 25 µL/L and clove and melaleuca 50 µL/L also obtained a decrease in GST. The clove oil 200 µL/L showed an increase in SOD activity and decrease in cat gene expression, as did the clove and cinnamon oil 25 µL/L and clove and melaleuca 50 and 125 µL/L. Both treatments with clove and melaleuca 50 and 125 µL/L and clove and cinnamon 25 µL/L decreased gst gene expression. Only clove and cinnamon oil 10 µL/L increased the expression of the sod gene. It can be concluded that the oils suffered an unbalance in the enzymatic analyses or a downregulation in the expression of enzymatic genes in relation to the control, however the use of the combined oils of clove (150 µL/L) and melaleuca (50 µL/L) is recommended, because it is effective as anesthetic, the mortality rate was none and did not present genotoxicity.

Keywords: genotoxicity, oxidative stress enzymes, gene expression, cinnamon, melaleuca.

1. INTRODUÇÃO

O óleo do cravo-da-índia é um produto natural obtido por destilação das flores, folhas e caules do cravo *Syzygium aromaticum* (*Eugenia aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*) (Javahery et al., 2012). Ele tem sido utilizado desde a antiguidade como anestésico natural (à base de planta) para aliviar dores de dente, cabeça e articulações. Apesar de ter um histórico como anestésico local para humanos (Woody et al., 2002), o cravo é considerado relativamente barato e mais eficiente quando comparado a outros óleos usados em peixes, sendo bastante difundido na aquicultura (Ross, Ross, 2008; Soto, Burhanuddin, 1995). Possui diversos ingredientes na sua composição, na sua grande maioria são o eugenol e iso-eugenol (Javahery et al., 2012).

Alguns estudos mais antigos sobre a utilização do cravo como anestésico para peixes avaliaram sua eficácia para sedação, indução e recuperação (Hikasa et al., 1986; Anderson et al., 1997). O objetivo era analisar o comportamento dos peixes durante e após o uso do anestésico e as mudanças visuais, como a coloração do animal (Soto, Burhanuddin, 1995; Waterstrat, 1999). Outros estudos foram surgindo e com eles a necessidade de avaliar a toxicidade do cravo, como foi o caso da letalidade aguda (Keene et al., 1998; Grush et al., 2004). Análises de perfis hematológicos e bioquímicos de sangue, bem como exames histológicos de tecidos avaliaram os efeitos da exposição dos peixes ao anestésico (Small, 2003; Velíšek et al., 2005). Entre as técnicas de genotoxicidade mais utilizadas estão: o ensaio cometa e teste de micronúcleo, que passaram a ser difundidos nessa área (Golomazou et al., 2016; Soares et al., 2019; Nascimento et al., 2020). Do ponto de vista dos produtores e do bem-estar do peixe as análises de estresse oxidativo foram fundamentais, pois o estresse pode gerar mortalidade dos peixes (Priborsky et al., 2015; Yousefi et al., 2018; Boaventura et al., 2020). Por fim, com o avanço da tecnologia surgiram técnicas capazes de detectar alterações moleculares, em genes, sendo estes os primeiros a responderem à um estímulo externo. Entre os genes mais comumente estudados estão os do receptor de glicocorticóide (*gr*), das proteínas de choque térmico 70 e 90 (*hsp70*, *hsp90*), da proteína reguladora aguda esteroidogênica (*estrela*), do citocromo 11B (*cyp11b1*), do fator induzível por hipóxia (*hif*) (Bodur et al., 2018), da *hepcidina* hepática (Abdelkhalek et al.,

2020), da glutathione peroxidase 1 (*gpx1*), da catalase (*cat*), da glutathione S-transferase 3 (*gst3*), da glutathione reductase (*gr*), da superóxido dismutase [Zn] (*sod2*) e da metalotioneína (*mt*) (Teles et al., 2019).

Outros anestésicos naturais vem sendo testados atualmente em peixes, incluindo a melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*). A melaleuca possui como principal componente o terpinen-4-ol (~41,98%), que apresenta função sedativa e atividade antioxidante (Souza et al., 2018). Além disso, melaleuca tem sido amplamente utilizada como agente antimicrobiano e antiinflamatório em peixes (Baldissera et al., 2014). O amplo espectro dessas atividades é atribuído principalmente ao terpinen-4-ol e 1,8-cineol, os principais componentes de seu óleo essencial (Baldissera et al., 2014). A canela (*C. zeylanicum*) possui em sua grande maioria os compostos cinnamaldeído, eugenol e linalol que representam cerca de ~85% da composição total do óleo (Kumar et al., 2016). Além de ser anestésico, a canela possui atividade antimicrobiana contra bactérias e antioxidante (Golomazou et al., 2016; Yuan et al., 2017). Inclusive, utilizadas em dietas elas atuam como imunoestimulantes em peixes (Santos et al., 2016).

Visto que estudos recentes mostraram efeitos tóxicos da concentração ideal de óleo de cravo (Golomazou et al., 2016; Nascimento et al. 2020), houve a necessidade de mitigar a toxicidade desse óleo. A finalidade é continuar utilizando o óleo de cravo por ser o mais utilizado e conhecido entre os produtores de peixes, porém em uma concentração que não seja genotóxica e anestesie o peixe profundamente. Diante do exposto, este trabalho buscou combinar os óleos essenciais da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) com o óleo do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), afim de aumentar a eficácia anestésica e diminuir os efeitos genotóxicos e de estresse oxidativo do óleo do cravo em tilápias.

2. HIPÓTESE

A combinação dos óleos essenciais da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e/ou melaleuca (*Melaleuca anternifolia*) aumenta a eficácia e diminui o estresse oxidativo e a genotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Objetivo é avaliar a combinação do óleo de cravo com óleo de canela e melaleuca na eficácia como anestésico e atenuação do estresse oxidativo e genotoxicidade em tilápias.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento dos peixes por meio do tempo de indução e recuperação utilizando os anestésicos individualmente e combinados;
- Avaliar o estresse oxidativo dos peixes utilizando biomarcadores enzimáticos como a SOD, CAT e GST;
- Avaliar os efeitos genotóxicos dos anestésicos por meio do ensaio cometa e teste de micronúcleo;
- Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo (*cat*, *gst* e *sod*) por meio da técnica molecular RTqPCR.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Aquicultura

Em 2050 a população mundial deve exceder a marca de 9 bilhões de pessoas, isso remete ao aumento dos impactos desproporcionais das mudanças climáticas e da degradação ambiental. Um crescimento na produção de alimentos é inevitável para atender essa demanda, entretanto, os recursos naturais necessários, como terra e água, ainda são escassos em um mundo mais movimentado, a população é obrigada a modificar a maneira como conduz as atividades econômicas diante das alterações climáticas globais (Kobayashi et al., 2015).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), existe uma grande diferença entre pesca e aquicultura: a primeira é baseada na retirada dos recursos pesqueiros do ambiente natural, já a segunda os organismos aquáticos são cultivados geralmente em um espaço controlado e confinado. A pesca é uma atividade extrativista, por outro lado, a aquicultura possibilita produtos mais homogêneos, com rastreabilidade durante a cadeia, gerando produtos que contribuem para a segurança alimentar. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (2018), por ser uma das atividades agropecuárias mais rápidas em resultados positivos, a aquicultura é capaz de responder ao crescimento populacional e contribuir com o combate à fome no mundo.

A aquicultura é importante globalmente, com um crescimento médio anual de 3,2% entre 1961 e 2016 (FAO, 2018). Em termos per capita, o consumo de peixes aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,2 kg em 2015, a uma taxa média de cerca de 1,5% ao ano (FAO, 2018). Essa expansão do consumo é resultado do aumento da produção, bem como a redução de desperdício. Em 2015, os peixes representaram cerca de 17% da proteína animal consumida pela população global (FAO, 2018). Como uma alternativa para reduzir a pressão da pesca sobre os estoques naturais, é a utilização de gaiolas em reservatórios, criação de peixes em cativeiros como tanques-redes, entre outros (Zaniboni-Filho et al., 2018).

4.2 Tilápia

Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (2020), o Brasil está em 4º lugar no ranking mundial como um dos maiores produtores de pescado do mundo e a produção de Tilápia participa com 60,6% da atividade. A tilápia é produzida em mais de 100 países, e sua produção anual é estimada em mais de 1,3 milhões de toneladas. Ela é considerada a espécie mais importante do século XXI entre os peixes de água doce criados em cativeiro, segundo a EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural) (Borges, 2009). Devido a sua rusticidade, rápido crescimento e carne de boa qualidade, é o peixe mais produzido no Brasil, atingindo uma produção anual maior que 100 mil t. Em virtude da grande demanda, a maioria da produção de tilápias é destinada ao abastecimento do mercado interno do país (Borges, 2009).

Dentre as espécies de tilápia utilizadas em cativeiro, destaca-se a tilápia-donilo (*O. niloticus*), que em termos de produção mundial é o quarto peixe mais produzido, sendo superada apenas pela carpa (*Ciprinus carpius*), salmão (*Salmo solar*) e panga (*Pangasius spp*), segundo a FAO (2018). Além da tilápia ser um dos peixes com maior potencial para a aquicultura, dentre os seus atributos destacam-se: crescimento rápido, alimenta-se dos itens básicos da cadeia trófica, se alimenta de proteína vegetal ou animal, possui a capacidade de se adaptar facilmente em diferentes ambientes e sistemas de produção, desova ao longo do ano, é resistente às doenças, às altas temperaturas, à baixa concentração de oxigênio dissolvido e à alta concentração de amônia na água (Ayroza, 2009; Borges, 2009). Outras qualidades como: carne saborosa com baixo teor de gordura (0,9 g / 100 g de carne) e de calorias (117 kcal / 100 g de carne), alto rendimento de filé (35-40 %) e sem espinhos em forma de "Y" (mioceptos), fazem com que a tilápia tenha uma grande aceitação no mercado, sendo assim esse peixe tem um enorme potencial para criação e comercialização com alto valor comercial (Souza, Maranhão, 2001; Ono, Kubitzka, 2003).

4.3 Manejo dos animais

O setor da aquicultura lida com diversas situações de estresse que podem prejudicar o bem-estar das espécies cultivadas, isto inclui o manuseio destes

animais, fertilização, confinamento, transporte e outros procedimentos que vão desde o incubatório até a fase comercial final (Sánchez-Muros et al., 2017; Souza et al., 2019). Essas práticas podem causar estresse provocando mortalidade, afetando a produção de peixes com a consequente perda econômica para o produtor. Além disso, o impacto dos estressores relacionados à aquicultura também pode predispor os peixes a doenças (Segner et al., 2012).

Pode-se citar como fatores estressores o manuseio e condições inadequadas de criação, como confinamento ou aglomeração, causando interações sociais acentuadas entre espécies específicas, baixa qualidade da água e possíveis patógenos (Segner et al., 2012). Esses fatores ameaçam o bem-estar animal, prejudicando diversas funções fisiológicas basais e interrompendo a homeostase interna, o que resultará em uma troca de energia com outras funções dos organismos para a sua adaptação (Segner et al., 2012).

O transporte de peixe vivo provoca a movimentação do peixe para ser colocado em um ambiente diferente de sua origem, sendo assim, esse processo vem acompanhado de alterações nas condições ambientais (Belema et al., 2017). Para se obter uma elevada taxa de sobrevivência até o destino final é necessário manter o peixe em boas condições (Belema et al., 2017). A troca da água é um fator importante para a manutenção da vida do peixe (Purbosari et al., 2019). Além da qualidade da água outros fatores são importantes para o sucesso do transporte como a temperatura, densidade, oxigênio e duração do transporte (Purbosari et al., 2019). Para ajudar na sobrevivência dos peixes a anestesia é bastante utilizada para manusear e transportar peixes vivos na aquicultura (Purbosari et al., 2019)

A fim de compensar os desequilíbrios produzidos pelos agentes estressores e recuperar o status homeostático dos peixes, é desencadeada uma resposta ao estresse que é iniciada e controlada pelo sistema endócrino (Schreck, Tort, 2016). Posteriormente às alterações comportamentais ativadas pelo estresse, o organismo pode sofrer alterações genéticas, metabólicas, imunológicas, energéticas, endócrinas e neurais (Schreck, Tort, 2016). Estes efeitos afetam negativamente outras funções vitais, como resistência a doenças, desenvolvimento, crescimento, comportamento ou reprodução e podem ocasionar a morte dos peixes (Souza et al., 2019). A fim de minimizar os efeitos do estresse causados pelas práticas intensas de

manejo na aquicultura, vários estudos avaliam o uso de anestésicos e sedativos para peixes (Souza et al., 2019).

4.4 Anestesia com produtos convencionais

A anestesia em peixes inclui a imobilização, sedação, analgesia (alívio da dor), amnésia (perda de memória) e inconsciência (narcose) (Zahl et al., 2011). Sedação é o efeito que reduz a sensibilidade, resultando em tranquilidade e calma. Já a narcose (anestesia geral) gera um estado de inconsciência e amnésia, inclui imobilização e alívio da dor (analgesia) (Zahl et al., 2011). Na aquicultura os anestésicos são utilizados, principalmente, para a imobilização de peixes, com o intuito de facilitar o seu manuseio, podendo ser aplicados também em outras situações, que vão desde a sedação leve durante um transporte, por exemplo, até anestesia geral e total em procedimentos mais agressivos (Skår et al., 2017). Nos peixes os anestésicos são administrados via dispersão na água e absorção pelas brânquias (Skår et al., 2017). Normalmente o seu efeito é avaliado pelo tempo de indução e recuperação, observando as reações reflexas a estímulos externos e capacidade de resposta ao manejo (Skår et al., 2017).

Quando anestesiados, os peixes estão em estado inconsciente onde ocorre a diminuição da sensibilidade à estímulos. A anestesia pode reduzir a atividade geral, a dor ou estresse, demanda de oxigênio, estímulos metabólicos, e facilita o manuseio (Martins et al., 2018). O objetivo do anestésico é produzir anestesia rápida entre 1 e 5 min, recuperação rápida (menor que 5 min), ser prático de usar, barato, solúvel em água, e não deixar resíduos nos peixes, no ambiente ou no homem (Martins et al., 2018). Os anestésicos podem ser de fontes naturais ou sintéticos. Por gerarem resíduos, os agentes sintéticos estão caindo em desuso, enquanto os agentes naturais estão sendo mais estudados e desenvolvidos (Purbosari et al., 2019). São utilizados vários agentes sintéticos para anestésiar os peixes, entre eles: metanossulfonato de tricaina (MS-222) (Skår et al., 2017), sulfato de quinaldina (Cuesta et al., 2004), etanol fenoxi (2-fenoxietanol, 2-PE) (Bahrekazemi, Yousefi, 2017), metomidato (Zahl et al., 2010), etomidato (Readma et al., 2017), benzocaína (para-aminobenzoato de etila) (Uehara et al., 2019).

Alguns efeitos adversos com o uso do MS-222 e benzocaína foram relatados em peixes (Ortuno et al., 2002). Diante da resposta inicial a esses compostos houve um aumento da glicemia e das frequências cardíaca e respiratória, elevados níveis de glicose no sangue, seguidas por um declínio da função cardiovascular e respiratória, esta podendo parar por completo (Hill et al., 2002). Como consequência ocorre hipoxemia, alterações na pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e dióxido de carbono, juntamente com níveis mais baixos de glicose no sangue e aumento dos níveis de lactato, hematócrito e hemoglobina (Ortuno et al., 2002). O uso do anestésico MS-222 produz um ambiente ácido, com pH na faixa de 2,8 a 3,9, quando adicionado diretamente à água, entretanto, quando se neutraliza o pH, a eficácia melhora e diminui o tempo de indução (Uehara et al., 2019).

Efeitos adversos também foram encontrados nos anestésicos com metomidato e 2-fenoxietanol, que incluem diminuição do ritmo cardíaco e pressão arterial, ventilação reduzida, redução da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial seguido pelo aumento de dióxido de carbono e diminuição do pH do sangue, consequentemente, elevados níveis de adrenalina e de glicose no sangue (Lambooi et al., 2009; Zahl et al., 2011). Verificou-se também que o 2-fenoxietanol tem efeitos imunodepressivos (Hill et al., 2002), assim como a benzocaína (Ortuno et al., 2002).

Purbosari e colaboradores (2019) realizaram uma extensa revisão comparando os efeitos dos anestésicos naturais e sintéticos e concluíram que os sintéticos geram impactos negativos no meio ambiente, assim como resíduos no peixe e no homem. Para garantir o bem-estar dos peixes, novos anestésicos estão sendo estudados. Os óleos essenciais de plantas surgem como uma alternativa de anestésicos naturais tornando-se preferíveis aos agentes sintéticos.

4.5 Óleos essenciais como anestésicos

Como uma alternativa natural às drogas sintéticas, os óleos essenciais e seus constituintes são os principais sedativos e anestésicos que vêm sendo testados em peixes (Martins et al., 2018). Não se sabe exatamente ou por qual via age a atividade anestésica de alguns óleos, entretanto pesquisas *in vitro* demonstraram que o eugenol é capaz de interagir com os receptores vanilóides bloqueando-os, dessa forma ocorre a inibição da transmissão da dor (Yang et al., 2003). Além disso,

o eugenol parece interagir com neurotransmissores envolvidos na sensibilidade à dor, causando um efeito agonista no GABA e antagonista no glutamato, os quais desempenham um papel importante na transmissão da dor (Yang et al., 2003; Guénette et al., 2007). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), causando depressão do SNC e anestesia, portanto a atividade agonista do eugenol no GABA poderia ser responsável pelos seus efeitos anestésicos (Guénette et al., 2007). O isoeugenol é conhecido por inibir os canais de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , que fornecem o potencial de relaxar e contrair os músculos, com a inibição não há o movimento; potencializa os receptores GABA_A , promovendo a sedação e relaxamento do organismo; e inibe os receptores NMDA, que apresentam atividade excitatória dos neurônios do SNC, uma vez inibido, diminui sua atividade/sinapses (Zahl et al., 2011).

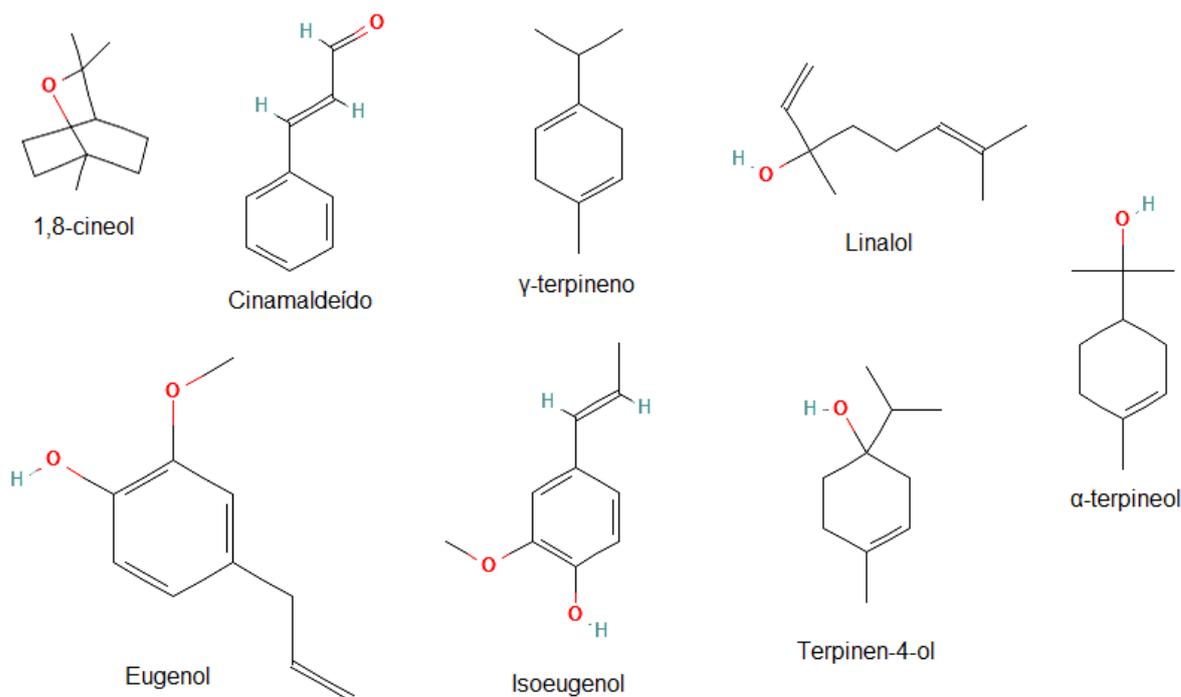
Os óleos essenciais de diversas plantas têm apresentado diferentes atividades biológicas comprovadas no cultivo de peixes (Teixeira et al., 2018). Esses óleos apresentam algumas vantagens em relação aos produtos convencionais utilizados na aquicultura. Pode-se citar como vantagens: são biodegradáveis, baixo custo na aquisição, são eficazes contra microorganismos patogênicos dos peixes, baixa toxicidade quando aplicados corretamente e baixo impacto ambiental (Teixeira et al., 2018). Estes compostos estão sendo testados em uma série de espécies de peixes como sedativos, anestésicos, melhoradores do desempenho zootécnico, antifúngicos, antiparasitários e antimicrobianos, podendo ser administrados por banhos terapêuticos e por via oral, com a finalidade de realizar tratamentos preventivos em animais aquáticos (Teixeira et al., 2018). Alguns óleos essenciais de plantas foram estudados e são indicados como sedativos e anestésicos, como o óleo de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (Correia et al., 2017), óleo de orégano (*Origanum sp.*), e de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) (Bodur et al., 2018), pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), e cânfora (*Cinnamomum camphora*) (Kizak et al., 2018), lúcia-lima ou verbena (*Aloysia triphylla*) (Teixeira et al., 2017), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) (Matulovic e Oshiro, 2016) e erva cidreira (*Lippia alba*) (Kampke et al., 2018). Estudos indicam que alguns óleos essenciais também podem ter atividade anti-parasitária, como no caso do hortelã-pimenta (*Menta piperita*), no qual banhos terapêuticos em peixes reduziram cerca de 70% a prevalência de parasitas (Hashimoto et al., 2016).

Segundo Santos e colaboradores (2020), é possível fazer uma combinação do óleo de melaleuca com cravo para aumentar sua eficácia anestésica. Este estudo avaliou o efeito do óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) em associação ao óleo de cravo no transporte de peixes. Os resultados mostraram que a combinação desses óleos melhorou a qualidade da água e reduziu os níveis plasmáticos de glicose e lactato e impediu a perda de íons, gerando menos estresse no transporte de peixes. Golomazou e colaboradores (2016), avaliaram seis óleos essenciais quanto a sua capacidade de induzir anestesia e seus efeitos genotóxicos. Todos os óleos testados se qualificaram como anestésicos para peixes-dourados. Entretanto, os óleos *E. aromático*, *O. vulgaree* *A. triphylla* induziram genotoxicidade nas doses aplicadas, enquanto a *M. alternifoliae* *J. communis* provocaram um efeito anti-genotóxico. Além do óleo de *C. zeylanicum* (canela) ser um agente anestésico eficaz, satisfazendo os critérios do anestésico ideal, ele demonstrou um efeito anti-estresse e genoprotetor.

4.6 Toxicidade

Apesar de um óleo essencial ser derivado de plantas não significa necessariamente que seja totalmente inofensivo, pois pode ter efeitos tóxicos e genotóxicos (Slamenova, Horvathova, 2013). O óleo essencial do cravo-da-índia é formado por diversas substâncias, entretanto os principais compostos são o eugenol e o isoeugenol (Figura 1), correspondendo aproximadamente 90-95% do óleo (Javahery et al., 2012). Esses compostos possuem ação anestésica comprovada (Yang et al., 2003; Zahl et al., 2011). O conteúdo e a proporção das substâncias dos óleos essenciais podem variar de acordo com a espécie utilizada, parâmetros climáticos e fatores agrônômicos como irrigação, fertilização e colheita (Kerrola et al., 1994). O terpinen-4-ol (Figura 1) é a substância majoritária do óleo essencial de melaleuca, aproximadamente 30-48% do óleo (Baldissera et al., 2014). Entretanto, outros compostos como γ -terpineno, α -terpineol e 1,8-cineol (Figura 1) também são encontrados em grandes quantidades (Baldissera et al., 2014). O óleo essencial da canela é formado por diversos compostos, sendo os principais: cinamaldeído, eugenol e linalol (Figura 1), que correspondem a 85% do óleo (Kumar et al., 2016). Uma vez que esses óleos são utilizados em peixes, é necessário realizar testes de toxicidade dessas substâncias, como é o caso da dose e

concentração letal. A Tabela 1 apresenta os valores de concentração letal (CL) para os compostos marjoritários dos óleos e o valor de dose letal (DL) para terpinen-4-ol e γ -terpineno, devido a ausência de dados. O Tween®20 é um dispersante utilizado para emulsificar óleo em água.



Fonte: Pubchem.

Figura 1: Estrutura química dos principais compostos dos óleos essenciais utilizados.

Tabela 1: Concentração (CL) e dose letal (DL) dos principais compostos dos óleos essenciais utilizados.

Compostos	CL50 ou DL50	Tempo	Espécie/Animal	Referências
	CL50 = 29,95 mg/L	48 h	<i>Betta splendens</i>	Pattanasiri et al., 2016
Eugenol	CL50 = 21 mg/L	96 h	<i>Danio rerio</i>	Grush et al., 2004
Isoeugenol	CL50 = 5,1 mg/L	96 h	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Clearwater et al., 2005

Terpinen-4-ol	DL50 = 1.000 - 4.300 mg/kg (oral)	-	Roedores	Opdyke, 1979 e Lewis, 2004
α -terpineol	CL50 = 6,3 mg/L	96 h	<i>Onchorhynchus kisutch</i>	Stroh et al., 1998
γ -terpineno	DL50 = 3.650 mg/kg (oral)	-	Roedores	Food and Cosmetics Toxicology, 1976
1,8-cineol	CL50 = 3.997,07 mg/L (fêmeas) e 1.701,93 mg/L (machos)	24 h	<i>Poecilia reticulata</i>	Bullangpoti et al., 2018
Cinamaldeido	CL50 = 0,311 mg/L	96 hpf	<i>Danio rerio</i>	Alves et al., 2021
Linalol	CL50 = 193,3 mg/L	120 hpf	<i>Danio rerio</i>	Singulani et al., 2018
	CL50 = 350 mg/L	24 h	Peixes	SIGMA-ALDRICH, 2014
TWEEN® 20	DL50 = 40.554 mg/kg (oral)	-	Roedores	SIGMA-ALDRICH, 2014

hpf = horas pós fecundação de embriões. CL50 e DL50 = concentração/dose letal que mata 50% dos indivíduos.

Uma análise deve ser realizada em anestésicos quando empregados em transporte de peixe, visto que o seu uso pode provocar complicações para os peixes que são indesejáveis aos cultivadores. Portanto, são estipuladas algumas avaliações quanto aos efeitos cardiovasculares, pressão sanguínea, resposta ao cortisol e algumas enzimas do sangue, que podem fornecer informações de que estas substâncias podem ser estressantes (Bahrekazemi, Yousefi, 2017). O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, em que predomina o pró-oxidante, provocando danos celulares. Isto ocorre devido a formação em excesso das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), superando assim, a capacidade fisiológica do organismo de eliminá-las (Possamai, 2009). Esse processo também pode ser definido como o

reflexo do desequilíbrio entre a produção e remoção destes produtos oxidantes, ou seja, quando os mecanismos de defesa antioxidante do animal são insuficientes para remover estes compostos, aumentando o estresse oxidativo, gerando danos às macromoléculas (Possamai, 2009; Cogo et al., 2009). As EROs e as ERNs causam oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a danos celulares (Cogo et al., 2009). Algumas enzimas antioxidantes catalisam reações para neutralizar EROs, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona S-transferase (GST) (Cogo et al., 2009).

Estas enzimas são utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo. A superóxido dismutase é uma das principais enzimas, capaz de converter o radical $O_2^{\bullet-}$ (principal ERO), que é responsável por causar sérios danos às células, visto que o mesmo pode gerar $OH\bullet$ e ser convertido em H_2O_2 pela SOD, que é menos reativo e pode ser metabolizado por outras enzimas, como a CAT e GPx (Cogo et al., 2009). A SOD também possui mecanismos envolvidos na detoxificação de outras EROs (Maia et al., 2012). A catalase por sua vez converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Souza, 2010). Além disso, a CAT atua na oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis, com o consumo de peróxido (Cogo et al., 2009). A glutatona S-transferase desempenha um papel fisiológico no início da desintoxicação de potenciais agentes alquilantes. Essas enzimas catalisam a reação de tais compostos através do grupo -SH da glutatona, neutralizando assim os locais eletrofílicos e tornando os produtos mais solúveis em água (Huber et al., 2008). Desse modo, ela vem sendo utilizada como biomarcador, pois a inibição da sua atividade está relacionada com a desestabilização da membrana lisossômica, esta desestabilização é causada pela exposição aos metais pesados ou ao estresse (radicais livres) (Cogo et al., 2009).

Ainda podem ser utilizados os testes do micronúcleo e ensaio do cometa para avaliar os efeitos genotóxicos de anestésicos no organismo do animal. O ensaio do cometa é uma técnica utilizada para avaliar a presença de lesões no DNA, no qual as células com o material nuclear lesionado se assemelham a um cometa devido a sua morfologia, cujo DNA perde sua integridade e migra por eletroforese (Speit et al., 2009). O teste do micronúcleo é recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, pois está relacionado à exposição de agentes clastogênicos (quebra de

cromossomos) e agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal), para isso, requer a proliferação celular para a observação desse biomarcador (Phan et al., 2015). Os micronúcleos surgem a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são agregados ao núcleo principal nas células filhas (durante a mitose), são visualizados como pequenos núcleos próximos ao núcleo principal (Oliveira et al., 2018).

Atualmente, vem sendo utilizados biomarcadores em níveis moleculares. A informação ao nível molecular é de grande importância para esclarecer o mecanismo molecular de toxicidade e a adaptação das populações à contaminação (Zhou et al., 2018). Quando o indivíduo entra em contato com alguma substância tóxica a primeira mudança que ocorre é a nível genético, essas mudanças bioquímicas são utilizadas como prova de exposição ou efeito tóxico (Lee et al., 2015). Bons biomarcadores moleculares são índices sensíveis à biodisponibilidade de poluentes ou substâncias tóxicas, e correspondem com respostas biológicas iniciais, servindo como um parâmetro de alerta precoce. Geralmente, as respostas dos biomarcadores são consideradas intermediárias entre as fontes de estresse/dano e os efeitos de nível superior, como por exemplo, nos tecidos (Van der Oost et al., 2003; Lee et al., 2015). Uma ferramenta poderosa para investigar os mecanismos de exposição dos organismos a substâncias tóxicas é a análise de expressão gênica, dentre elas a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR ou RTqPCR), cujo método é utilizado para a quantificação de transcrições de mRNA de um gene de interesse previamente selecionado em amostras biológicas (Zhou et al., 2018).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado após aprovação do comitê de ética e bem-estar animal da Universidade Vila Velha (CEUA/UVV nº 578-2020).

5.1 Desenho experimental

As tilápias foram obtidas da piscicultura BioAlevinus em Ibirapu - ES, transferidas ao Laboratório de Ictiologia Aplicada na UVV e aclimatadas por 15 dias em tanques de polietileno de 1.000 litros. Os tanques foram abastecidos com água oriunda do sistema de abastecimento público. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nutriave 36% de proteína). Após a aclimação, os peixes foram aleatoriamente alocados em grupos com dez animais. Os óleos essenciais utilizados foram: cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* - Phytoterápica), tea tree/melaleuca (*Melaleuca anternifolia* - Phytoterápica) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* - Laszlo).

Experimento 1: anestesia com os óleos essenciais individuais.

Foram utilizados 80 peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) ($10,71 \pm 0,33$ g; $9,0 \pm 0,1$ cm). O primeiro experimento foi dividido em controle e 7 grupos tratados com diferentes concentrações dos óleos essenciais de melaleuca (450 e 500 $\mu\text{L/L}$) (Hajek et al., 2010), cravo-da-índia (100, 150 e 200 $\mu\text{L/L}$) (Uehara et al., 2019) e canela (75 e 100 $\mu\text{L/L}$) (Golomazou et al., 2016), afim de se avaliar a eficiência dos óleos como anestésico individualmente, seu tempo de indução e recuperação.

A qualidade da água durante o experimento foi: temperatura ($26,3 \pm 0,3$ °C), oxigênio dissolvido ($7,52 \pm 0,37$ mg/L), pH ($6,33 \pm 0,04$) e condutividade ($96,70 \pm 0,28$ mS/cm) através do multiparâmetro YSI 85. As análises de dureza total ($61,94 \pm 1,38$ mg de CaCO_3/L), alcalinidade total ($13,26 \pm 2,29$ mg de CaCO_3/L), nitrito ($0,004 \pm 0,002$ mg/L) e amônia ($0,103 \pm 0,066$ $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L) também foram realizadas para o acompanhamento da qualidade da água pelos métodos descritos por APHA (2005).

Experimento 2: anestesia com os óleos essenciais combinados.

No segundo experimento foram utilizados 50 exemplares da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) ($16,69 \pm 0,89$ g; $10,0 \pm 0,2$ cm). Após o experimento 1, com base nos resultados de genotoxicidade (ensaio cometa) e eficácia da anestesia (tempo de indução), foram escolhidas as concentrações utilizadas no experimento 2. O óleo do cravo foi genotóxico na concentração de $200 \mu\text{L/L}$, porém foi o mais eficaz como anestésico induzindo anestesia até o último estágio. Já a concentração de $150 \mu\text{L/L}$ não causou genotoxicidade, entretanto nem todos os peixes desse tratamento atingiram o último estágio. Diante disso, no segundo experimento foi testada a combinação do óleo do cravo-da-índia ($150 \mu\text{L/L}$) com os óleos de melaleuca (50 e $125 \mu\text{L/L}$) e canela (10 e $25 \mu\text{L/L}$), correspondendo a uma concentração de 10% e 25% da concentração utilizada no primeiro experimento ($500 \mu\text{L/L}$ para o óleo de melaleuca e $100 \mu\text{L/L}$ para o óleo de canela), para determinar qual a melhor proporção em questão de eficiência anestésica e toxicidade para os peixes. A finalidade da segunda parte é continuar utilizando o óleo de cravo por ser o mais utilizado e conhecido entre os produtores de peixes, porém em uma concentração que não seja genotóxica e anestesia até o último estágio. Para o controle foi utilizado água e dispersante (Tween®20).

A qualidade da água durante o segundo experimento foi: temperatura ($26,7 \pm 0,5$ °C), oxigênio dissolvido ($7,61 \pm 0,29$ mg/L), pH ($6,40 \pm 0,04$) e condutividade ($98,93 \pm 1,11$ mS/cm) através do multiparâmetro YSI 85. As análises de dureza total ($53,41 \pm 4,10$ mg de CaCO_3/L), alcalinidade total ($13,27 \pm 1,69$ mg de CaCO_3/L), nitrito ($0,096 \pm 0,014$ mg/L) e amônia ($0,042 \pm 0,012$ $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L) também foram realizadas para o acompanhamento da qualidade da água pelos métodos descritos por APHA (2005).

Os experimentos foram realizados após 15 dias de aclimação. Os peixes foram individualmente transferidos para um aquário de 4 litros para a indução da anestesia e avaliação dos eventos comportamentais. O tempo de cada estágio de anestesia foi anotado utilizando os estágio descritos na Tabela 2. Após 10 minutos de anestesia o peixe foi transferido para um aquário limpo (livre de anestésico) de 16 litros e aeração constante, onde foi observado o tempo de recuperação. Cada tratamento descrito foi realizado em 10 animais.

Ao final do período experimental do comportamento de ambos os experimentos, 48h após a recuperação da anestesia, os peixes foram retirados dos aquários para coleta de sangue e fígado (Figura 2). Todos os peixes foram eutanasiados com uma overdose de benzocaína 10%. Um estudo comprovou que a benzocaína não interfere nos resultados do ensaio cometa (Gontijo et al, 2003). O sangue foi coletado por punção da veia caudal com seringas heparinizadas, no qual foi usado para as análises de ensaio cometa e micronúcleo. Após este procedimento, foram medidos o tamanho e o peso de cada animal. O fígado foi removido para as análises da atividade das enzimas antioxidantes (GST, CAT e SOD) e expressão de seus genes (*gst*, *cat* e *sod*), e congelado à -80 °C até o momento das análises.

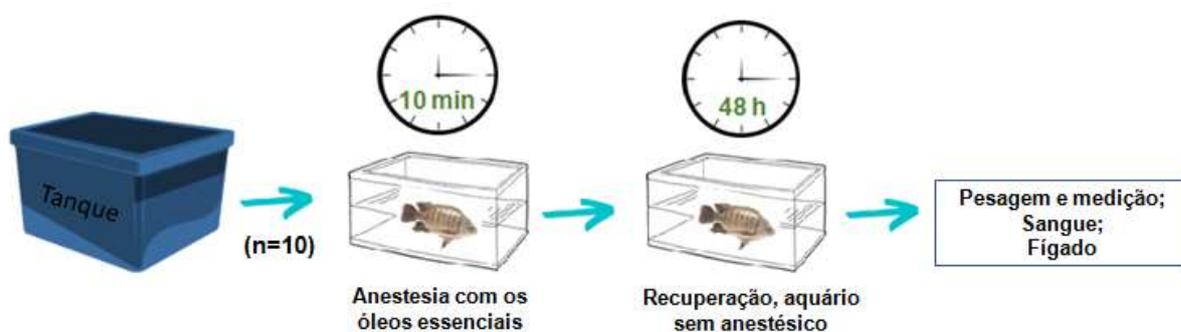


Figura 2. Esquema do desenho experimental.

5.2 Análise comportamental

A eficácia dos agentes anestésicos foi avaliada através da monitorização do tempo e comportamento dos peixes ao longo das fases de anestesia e recuperação. O progresso da indução, profundidade da anestesia e recuperação foram divididos em fases (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios de indução anestésica e de recuperação utilizados para determinar a eficácia de um anestésico.

Estágios da anestesia	Sinais fisiológicos e comportamentos observados
I	Sedação: responde a estímulos, mas redução do movimento e da ventilação, pouca analgesia

II	Anestesia: perda parcial do equilíbrio, boa analgesia, diminuição da capacidade de natação
III	Anestesia profunda: perda total do tônus muscular e do equilíbrio, ventilação quase inexistente, perda total de reação a grandes estímulos, animal virado
IV	Anestesia cirúrgica: movimentos oculares irregulares lentos e perda de reação aos estímulos.
Recuperação	Tempo até ao retorno completo da capacidade de natação

Adaptado de Ross e Ross (2008), Kampke et al. (2018).

5.3 Análise de genotoxicidade

5.3.1 Ensaio Cometa

A análise de fragmentação de DNA foi realizada utilizando ensaio cometa seguindo o método modificado de Tice et al. (2000). Foram adicionados 10 µL de sangue à 1000 µL de soro bovino fetal, dessa mistura 20 µL (soro/sangue) foi adicionado à 120 µL de agarose low melting point (0,8%) e colocados em uma lâmina com uma camada de agarose (normal melting point), esse processo foi feito em duplicata. O processo de adicionar o soro/sangue com agarose low melting na lâmina foi repetido mais duas vezes, formando três camadas de agarose ao final para melhor visualização das células. Para a etapa de lise foi feita uma solução contendo NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, em 100 mL dessa solução são adicionados Triton X-100 1% e DMSO 10%. As lâminas foram imersas na solução de lise "over night", por 15 h aproximadamente. A eletroforese foi feita em uma cuba (32 V e 0,3 A) contendo uma solução tampão de EDTA 200 mM e NaOH 300 mM por 20 min. Após essas etapas as lâminas foram neutralizadas com uma solução de Tris 0,4 M, as células foram fixadas com etanol e coradas com SYBR® Green 10% por 15 min. Os danos no DNA foram medidos de acordo com tamanho da "cauda" formada pelo arraste de DNA fragmentado na etapa de eletroforese. Os danos foram classificados seguindo os critérios estabelecidos por Grazeffe et al. (2008): Classe 0 - não há formação de cauda; Classe 1 - a cauda formada é menor que o diâmetro do núcleo; Classe 2 - cauda com variação de comprimento entre 1x a 2x o diâmetro do núcleo; Classe 3 - Cauda maior que 2x o diâmetro do núcleo e Classe 4 - Apoptose

da célula. O índice de danos (ID) foi analisado contabilizando o número de células danificadas multiplicado pelo valor da classe do dano (0 a 4). A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio de fluorescência e objetiva de 40x, as células foram analisadas em teste cego e sempre pelo mesmo observador.

5.3.2 Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo (MN) seguiu o método estabelecido por Hayashi (2000). 5 µL do sangue extraído foi diluído em 5 µL de soro bovino fetal (FBS). A partir dessa mistura, foi feito um esfregaço com 5 µL sangue/soro, esse processo foi feito em duplicata. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por uma noite. Posteriormente, foi realizada a fixação das células em metanol por 10 minutos. Antes da microscopia, as células foram coradas com 0,003% de laranja de acridina em tampão fosfato salino de Dulbecco, por 3 minutos. Para a contagem das células (1.000 células por lâminas) foi utilizado um microscópio de epifluorescência usando um filtro especial, no objetiva de 100x com óleo de imersão, avaliando se há presença ou não de micronúcleo, que consiste em um pequeno núcleo ao lado do núcleo original da célula. A leitura das lâminas foi realizada em teste cego, sempre pelo mesmo observador.

5.4 Análise enzimática do estresse oxidativo

5.4.1 Preparo do homogenato de fígado

Depois de descongeladas, as amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato (TRIS 20 mM, EDTA 1 mM, Sacarose 0,5 mM, KCl 0,15 mM, DTT 1mM e PMSF 0,1 mM) com pH 7,6, o volume de tampão utilizado foi o peso das amostras x4 (1:4; fator de diluição 5). Centrifugadas à 13.000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado na determinação de proteínas totais e nas análises das atividades das enzimas antioxidantes (CAT, GST e SOD).

5.4.2 Proteína total

Antes de realizar as análises de atividade das enzimas antioxidantes foi necessário quantificar a proteína das amostras para posterior cálculo das atividades da CAT, SOD e GST. A concentração de proteínas totais nos fígados foi

determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino. As amostras foram lidas em um leitor de placa (Molecular Device – Spectra Max 190) no comprimento de onda de 595 nm.

5.4.3 Catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6)

A metodologia utilizada para determinar a atividade da catalase foi a proposta por Aebi (1984), cuja avaliação se dá pela diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio no comprimento de onda de 240 nm a uma temperatura de 25°C. Foi empregado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio (10 mM) e tampão TE (Tris HCL 1 M e EDTA 5 mM), sendo que as amostras foram diluídas 10x no tampão TE. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Biospectro SP-220). Na cubeta de quartzo foi adicionado 10 µL do homogeneizado em 990 µL de tampão de reação. A atividade da catalase será expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg proteína).

5.4.4 Glutathione S-transferase (GST; E.C. 2.5.1.18)

A atividade da GST foi avaliada utilizando o tampão fosfato (pH 7,6), 1 mM de GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada por meio da leitura da absorbância (340 nm), utilizando um leitor de placa (Molecular Device – Spectra MAX 190) a uma temperatura de 25°C. Seguindo a metodologia proposta por Habig e colaboradores (1997) e Habig e Jakoby (1981) para estimar a atividade absoluta da GST. A atividade foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg proteína).

5.4.5 Superóxido dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1)

Foi utilizada a metodologia proposta por Flohé e Otting (1984) para determinar a atividade da SOD utilizando a solução de xantina 1 mM, solução de xantina oxidase 0,2 U/mL e mistura reativa. A partir da leitura da absorbância em 550 nm da amostra em um espectrofotômetro (Biospectro SP-220) para calcular a atividade cinética da SOD. A atividade absoluta da SOD foi estimada usando o coeficiente de redução do citocromo C e expressa em U/min/mg proteína.

5.5 Análise molecular

5.5.1 Extração do RNA

As amostras de fígado foram retiradas para a obtenção do RNA, armazenadas em uma solução de RNA^{later}® e mantidas à -80°C. O RNA total foi obtido utilizando o kit Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad, Hercules, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação, pureza e integridade do RNA foram determinadas por espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e eletroforese em gel de agarose a 1%.

5.5.2 Quantificação da expressão gênica

A expressão gênica dos marcadores moleculares de estresse oxidativo (*cat*, *gst* e *sod*) de *Oreochromis niloticus* foi analisada. Oligonucleotídeos específicos para os genes utilizados como marcadores moleculares foram desenhados e utilizados para avaliar a expressão gênica pela técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Os primers específicos foram projetados com o auxílio do software Primer3 v 4.0.4. (Untergasser et al., 2012) usando sequências de nucleotídeos do transcriptoma de fígado de *O. niloticus* depositados no banco de dados Sequence Read Archive (SRA) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para normalizar a expressão gênica, o gene que codifica o fator de alongamento 1 alpha (EFl α) de *O. niloticus* foi usado como referência. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total usando o kit iScript Reverse Transcription (Bio-RAD, Hercules, CA, EUA), usando as recomendações do fabricante. A RT-qPCR foi realizada utilizando o Kit iTaq universal SYBER® Green (BioRad, Hercules, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, e o termociclador GFX96 (BioRad, Hercules, EUA). Os dados de expressão gênica foram analisados por meio do software CFX Maestro (BioRad, Hercules, EUA). A expressão foi normalizada usando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

5.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (SEM). Primeiramente foi verificado se os dados apresentam distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O estudo estatístico para a comparação dos resultados da

análise comportamental (tempos) entre os grupos de diferentes anestésicos foi verificado por uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). Para os dados sem distribuição normal (teste de micronúcleo), a análise estatística foi realizada por meio de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a análise enzimática e ensaio cometa foi utilizado o método de Dunnett ($p < 0,05$) para a comparação dos resultados com o controle. Para os ensaios moleculares, a análise estatística foi determinada pelo teste t padrão ($p < 0,05$). Apenas os genes com uma alteração ≥ 2 vezes a expressão relativa foram considerados biologicamente relevantes. Todos os testes estatísticos, bem como os gráficos, foram feitos no programa SigmaPlot versão 12.5 e Excel.

6. RESULTADOS

Experimento 1: anestesia com os óleos essenciais individuais.

6.1 Análise comportamental

A Tabela 3 apresenta as médias dos resultados dos tempos de indução da anestesia nas quatro fases de recuperação, descritos na Tabela 2, dos óleos essenciais utilizados individualmente. Todos os óleos essenciais demonstraram ter propriedades sedativas, em baixas concentrações e anestésicas, em altas concentrações. No estágio I da anestesia (sedação), não houve diferença significativa entre os tratamentos, os tempos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Nos estágio II (anestesia) o tratamento utilizando a canela 75 $\mu\text{L/L}$ foi o que levou mais tempo para anestesiá-los os peixes ($p < 0,05$), enquanto que os tratamentos com óleo de cravo 150, 200 $\mu\text{L/L}$ e melaleuca 500 $\mu\text{L/L}$ obtiveram tempos semelhantes. No estágio III (anestesia profunda) o óleo de canela na concentração de 75 $\mu\text{L/L}$ foi o que levou mais tempo para que os animais atingissem a anestesia profunda, juntamente com a concentração de 100 $\mu\text{L/L}$ da canela. Já no estágio IV (anestesia cirúrgica), o tratamento com óleo de cravo em 200 $\mu\text{L/L}$ levou menos tempo para atingir esse estágio, entretanto os tratamentos contendo cravo em 150 $\mu\text{L/L}$, melaleuca em 450 e 500 $\mu\text{L/L}$, obtiveram tempos semelhantes ao cravo 200 $\mu\text{L/L}$ ($p > 0,05$). O óleo essencial de canela em 75 $\mu\text{L/L}$ não atingiu o último estágio de anestesia. O uso dos óleos de cravo em 100 $\mu\text{L/L}$ e canela em 100 $\mu\text{L/L}$ obtiveram tempos semelhantes ($p > 0,05$), porém foram os tratamentos que levaram mais tempo até atingir o estágio IV. Apesar da concentração do óleo de cravo em 200 $\mu\text{L/L}$ ter chegado mais rápido até a anestesia final, foi o tratamento que mais demorou para o animal se recuperar totalmente, juntamente com a concentração de 100 $\mu\text{L/L}$ desse óleo. Já as recuperações dos animais com óleo de melaleuca 450 e 500 $\mu\text{L/L}$ e de canela 75 $\mu\text{L/L}$ foram mais rápidas, levando menos tempo para se recuperarem. Nem todos os peixes atingiram o último estágio nas concentrações mais baixas de cada tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo (s) de indução e recuperação de *O. niloticus* anestesiado com diferentes concentrações dos óleos essenciais ($\mu\text{L/L}$) (experimento 1).

Estágios da anestesia	Óleo de cravo ($\mu\text{L/L}$)			Óleo de canela ($\mu\text{L/L}$)		Óleo de melaleuca ($\mu\text{L/L}$)	
	100	150	200	75	100	450	500
I	46,30 \pm	44,50 \pm	34,80 \pm	44,10 \pm	47,11 \pm	42,40 \pm	39,00 \pm
	3,95 a	3,65 a	2,81 a	7,11 a	9,31 a	4,27 a	3,23 a
II	240,70 \pm	139,40 \pm	134,90 \pm	336,40 \pm	265,90 \pm	223,00 \pm	143,00 \pm
	18,61 b	10,73 c	6,82 c	23,71 a	16,19 b	10,65 b	10,61 c
III	369,10 \pm	246,40 \pm	168,20 \pm	467,13 \pm	412,70 \pm	340,80 \pm	225,70 \pm
	24,91 b	19,04 c	6,90 c	20,70 a	23,02 ab	17,92 b	14,68 c
IV	530,75 \pm	465,80 \pm	391,00 \pm	-	531,29 \pm	513,00 \pm	471,00 \pm
	19,29 a*	30,34 ab**	33,11 b		21,59 a***	26,51 ab****	18,93 ab
Recuperação	643,20 \pm	563,20 \pm	969,10 \pm	317,60 \pm	547,50 \pm	275,30 \pm	284,00 \pm
	48,65 ab $_{\alpha}$	49,52 b $_{\alpha}$	117,34 a $_{\alpha}$	26,52 c	57,42 b $_{\alpha}$	27,27 c	28,20 c

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Diferentes letras significam diferenças significativas teste de Tukey ($p < 0,05$). *6 peixes não atingiram esse estágio de anestesia; **5 peixes não atingiram esse estágio de anestesia; - nenhum peixe atingiu esse estágio de anestesia; ***3 peixes não atingiram esse estágio de anestesia; ****7 peixes não atingiram esse estágio de anestesia. α 1 peixe morreu durante esse experimento.

6.2 Análises de genotoxicidade

A Figura 3A apresenta os resultados do ensaio cometa do experimento 1, onde houve diferença significativa apenas entre o controle (58,0±12,2 ID) e a concentração mais alta do óleo do cravo (200 µL/L) (140,8±28,7 ID) ($p = 0,039$). Nos demais tratamentos não houve diferença significativa. Os resultados do teste de micronúcleo não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos e o controle conforme a Figura 3B.

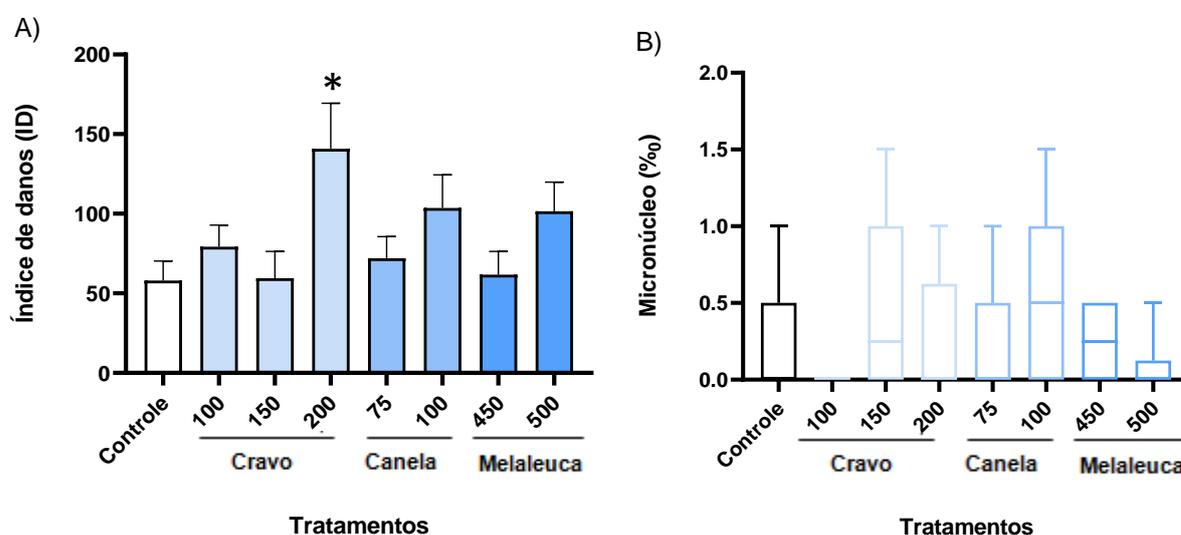


Figura 3. [A] Índice de danos (ID) nas células após o ensaio cometa. Os dados são apresentados como média e erro padrão.[B] Frequência de micronúcleo nas células dos peixes anestesiados com diferentes concentrações dos óleos essenciais (µL/L). Os resultados são expressos em mediana e erro padrão da frequência (%) de micronúcleos. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.3 Análise da atividade de enzimas antioxidantes

Os resultados da atividade da CAT (Figura 4A) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e o controle ($p > 0,05$). A Figura 4B apresenta os resultados da atividade da enzima GST, onde os tratamentos apresentaram uma diminuição da sua atividade quando comparada ao controle ($p < 0,05$). Apenas o

tratamento com óleo essencial de melaleuca 450 $\mu\text{L/L}$ ($2,65 \pm 0,27$ U/mg proteína) que não se diferenciou do controle ($3,81 \pm 0,67$ U/mg proteína) ($p > 0,05$). A Figura 4C apresenta os resultados da enzima SOD. Todos os resultados foram semelhantes ao controle, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

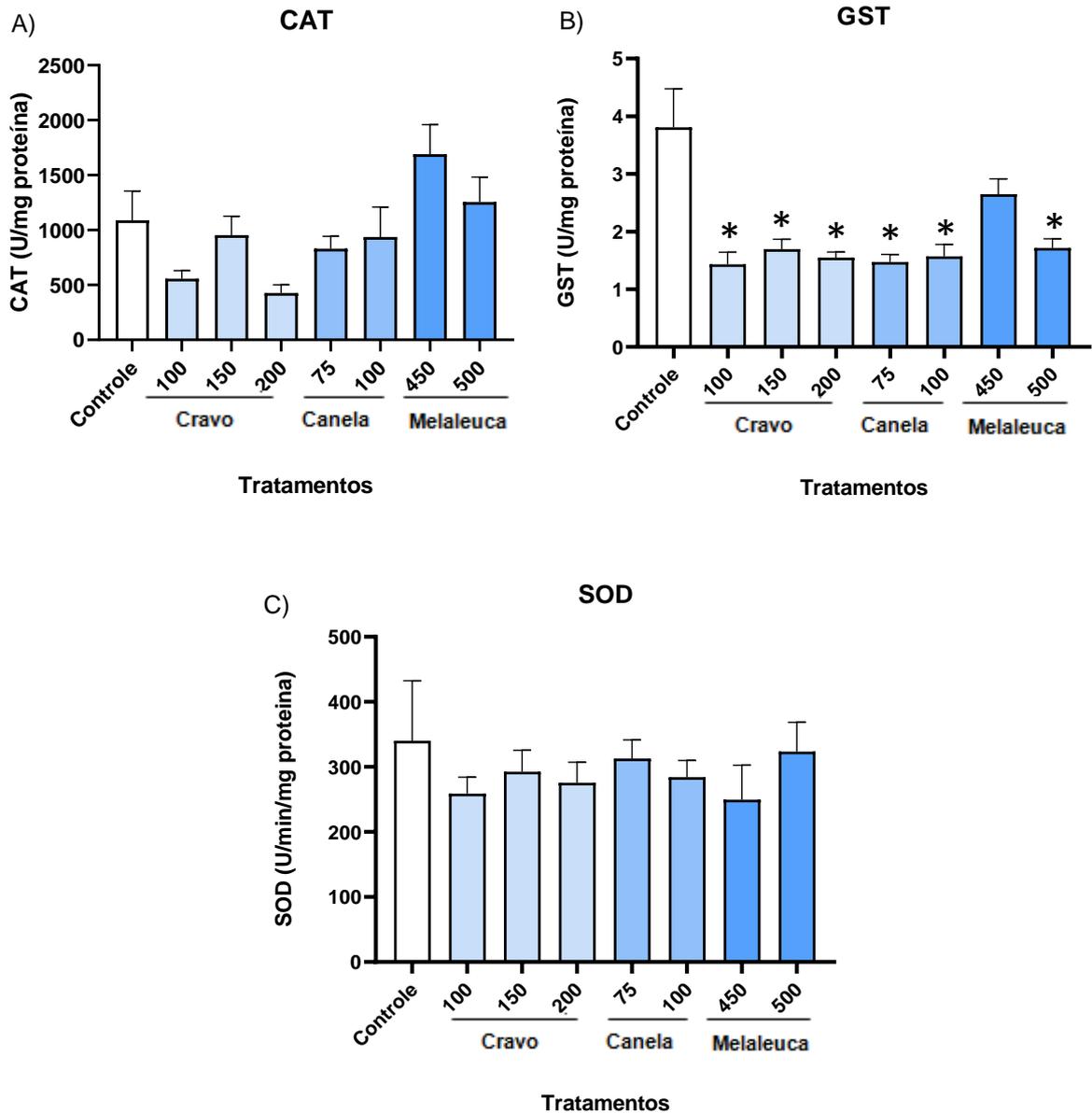
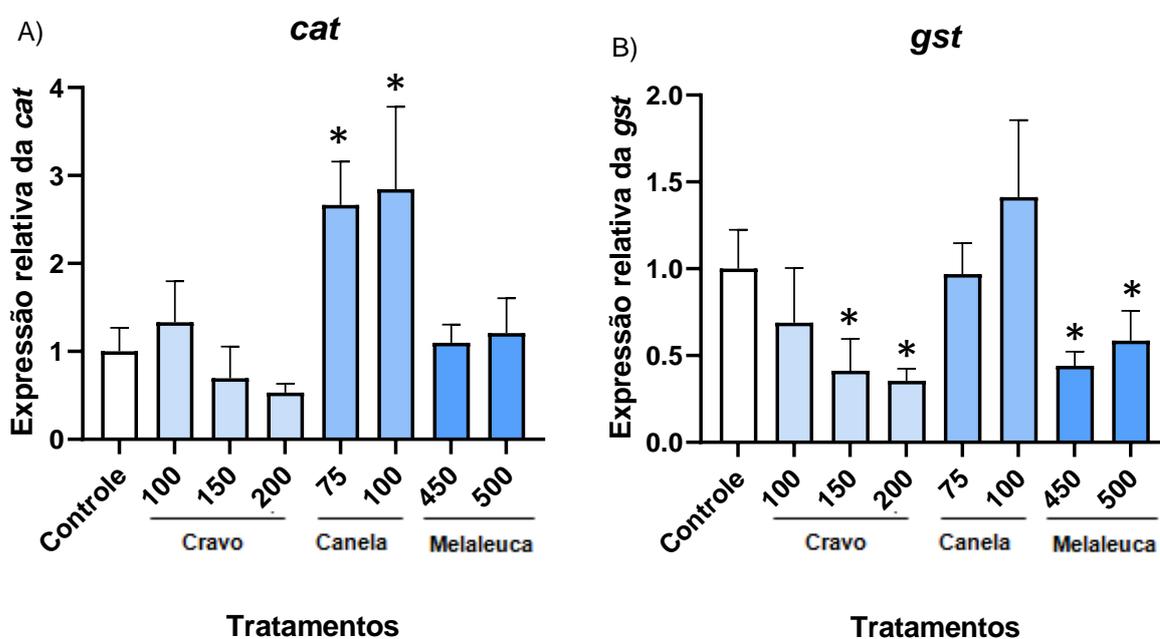


Figura 4. Atividade da enzima catalase [A], glutationa S-transferase [B] e superóxido dismutase [C] no fígado de *O. niloticus* após anestesia com diferentes concentrações dos óleos essenciais ($\mu\text{L/L}$). Os dados são apresentados como média

e erro padrão. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.4 Análise molecular

A Figura 5A apresenta os resultados da expressão gênica relativa da *cat*, onde apenas nos tratamentos com o óleo de canela de 75 e 100 $\mu\text{L/L}$ houve diferença significativa ($p < 0,001$) com expressão relativa de 2,7 e 2,8 vezes maior em relação ao controle, respectivamente. A Figura 5B se refere à expressão gênica de *gst*. Os tratamentos com óleo de cravo nas concentrações de 150 e 200 $\mu\text{L/L}$ obtiveram uma regulação negativa de -2,4 e -2,8 vezes na expressão gênica em relação ao controle, respectivamente ($p < 0,001$). Já os tratamentos com o óleo de melaleuca de 450 e 500 $\mu\text{L/L}$ demonstraram diferenças significativas ($p < 0,001$) na expressão gênica de *gst*, entretanto apenas a concentração de 450 $\mu\text{L/L}$ apresentou uma regulação negativa biologicamente relevante de -2,3 vezes em relação ao controle. Como apresentado na Figura 5C, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na expressão do gene *sod*. Todos os tratamentos se mantiveram com os valores semelhantes ao controle.



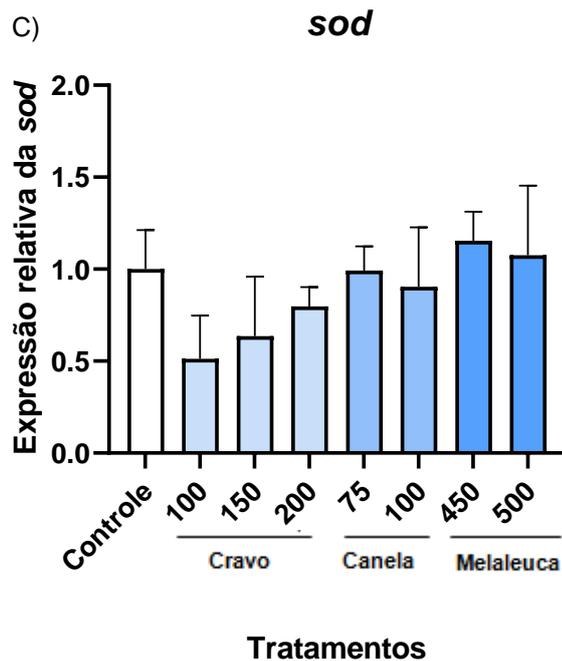


Figura 5. Expressão gênica relativa da catalase [A], glutathione S- transferase [B] e superóxido dismutase [C] em amostras de fígado de *O. niloticus* anestesiados com diferentes concentrações dos óleos essenciais ($\mu\text{L/L}$). Os dados são apresentados como média e erro padrão. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

Experimento 2: anestesia com os óleos essenciais combinados.

6.5 Análise comportamental

Todos as combinações dos óleos essenciais demonstraram ter propriedades anestésicas nas doses examinadas, todos os peixes atingiram o último estágio de anestesia (Tabela 2 - tempo de indução de anestesia). A Tabela 4 apresenta as médias dos resultados dos tempos de indução da anestesia nas quatro fases e recuperação. No segundo experimento os resultados são comparados ao do óleo de cravo 200 $\mu\text{L/L}$, pois este seria o ideal se não provocasse genotoxicidade. No estágio I da anestesia, apenas a combinação de óleo de cravo e melaleuca 125 $\mu\text{L/L}$ se diferenciou do óleo de cravo 200 $\mu\text{L/L}$ ($p = 0,002$), atingindo este estágio mais rapidamente. Já no estágio II, a combinação de cravo e canela 10 $\mu\text{L/L}$ demorou mais tempo para atingir a anestesia, as demais concentrações tiveram tempos

semelhantes ao do cravo 200 $\mu\text{L/L}$ ($p > 0,05$). No estágio III, os dois tratamentos utilizando cravo e canela 10 e 25 $\mu\text{L/L}$ levaram mais tempo que os demais para atingir este estágio, assim como óleo de cravo e melaleuca 50 $\mu\text{L/L}$. No estágio IV e na recuperação não houve diferença significativa entre os tratamentos, os tempos foram semelhantes ao do tratamento com óleo de cravo de 200 $\mu\text{L/L}$ ($p > 0,05$). Isso indica que ao usarmos uma concentração mais baixa de cravo combinado ao óleo de canela e melaleuca, estas combinações fazem com o que o peixe atinja o último estágio de anestesia, se igualando ao tempo do cravo na maior concentração (200 $\mu\text{L/L}$).

Tabela 4. Tempo (s) de indução e recuperação de *O. niloticus* anestesiado com a combinação de óleos essenciais ($\mu\text{L/L}$) (experimento 2).

Estágio da anestesia	Óleo de cravo 200 $\mu\text{L/L}$	Óleo de cravo 150 $\mu\text{L/L}$			
		Canela 10 $\mu\text{L/L}$	Canela 25 $\mu\text{L/L}$	Melaleuca 50 $\mu\text{L/L}$	Melaleuca 125 $\mu\text{L/L}$
I	34,80 \pm 2,81	28,50 \pm 5,17	30,50 \pm 2,99	27,30 \pm 3,00	13,67 \pm 1,58 *
II	134,90 \pm 6,82	195,30 \pm 16,86 *	155,37 \pm 9,18	147,00 \pm 10,52	157,33 \pm 26,04
III	168,20 \pm 6,90	303,20 \pm 20,76 *	265,87 \pm 20,29 *	236,90 \pm 15,53 *	237,67 \pm 34,56
IV	391,00 \pm 33,11	495,30 \pm 28,78	451,75 \pm 16,88	420,70 \pm 30,83	334,50 \pm 53,90
Recuperação	969,10 \pm 117,34 α	697,10 \pm 57,95 α	860,25 \pm 35,88 $\alpha\alpha$	865,50 \pm 93,31	1121,17 \pm 190,85 $\alpha\alpha\alpha$

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferenças significativas em relação ao tratamento com óleo de cravo 200 $\mu\text{L/L}$. ($p < 0,05$). α 1 peixe morreu durante esse tratamento; $\alpha\alpha$ 2 peixes morreram durante esse tratamento; $\alpha\alpha\alpha$ 4 peixes morreram durante esse tratamento.

6.6 Análise de genotoxicidade

A Figura 6A apresenta os resultados do ensaio cometa do experimento 2. Apenas o tratamento utilizando o óleo de cravo 200 $\mu\text{L/L}$ foi significativamente diferente do controle ($p < 0,001$). Os demais tratamentos do experimento 2 não tiveram diferenças significativas. Indicando assim, que a combinação das diferentes proporções do óleo de melaleuca e canela com o óleo de cravo na concentração de 150 $\mu\text{L/L}$ não causou genotoxicidade aos peixes. No teste de micronúcleo não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos do experimento 2 como mostra a Figura 6B.

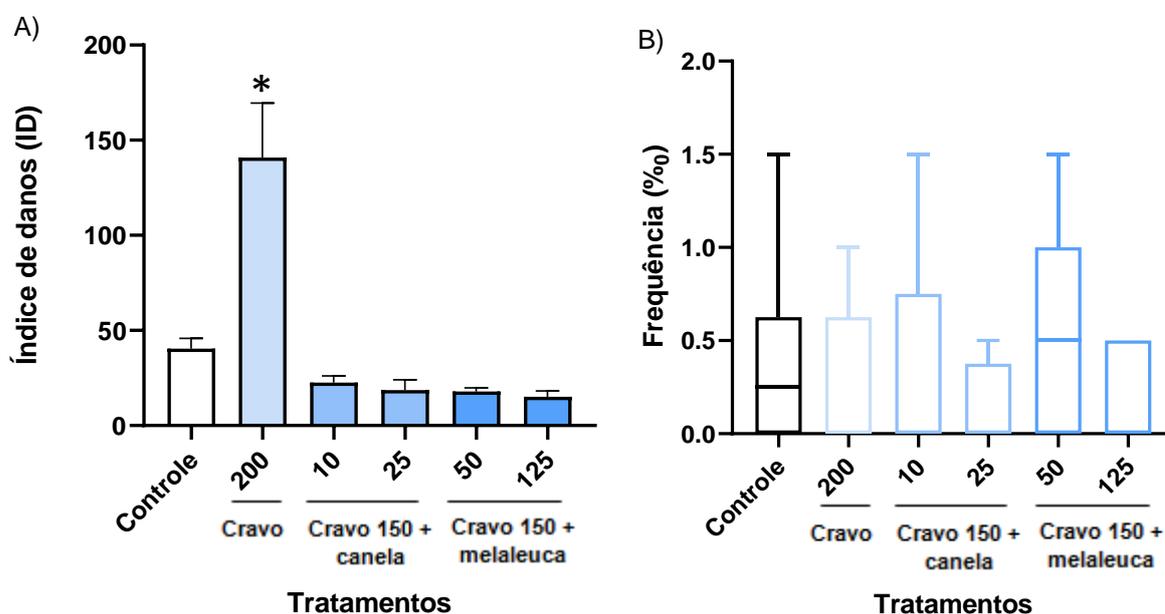
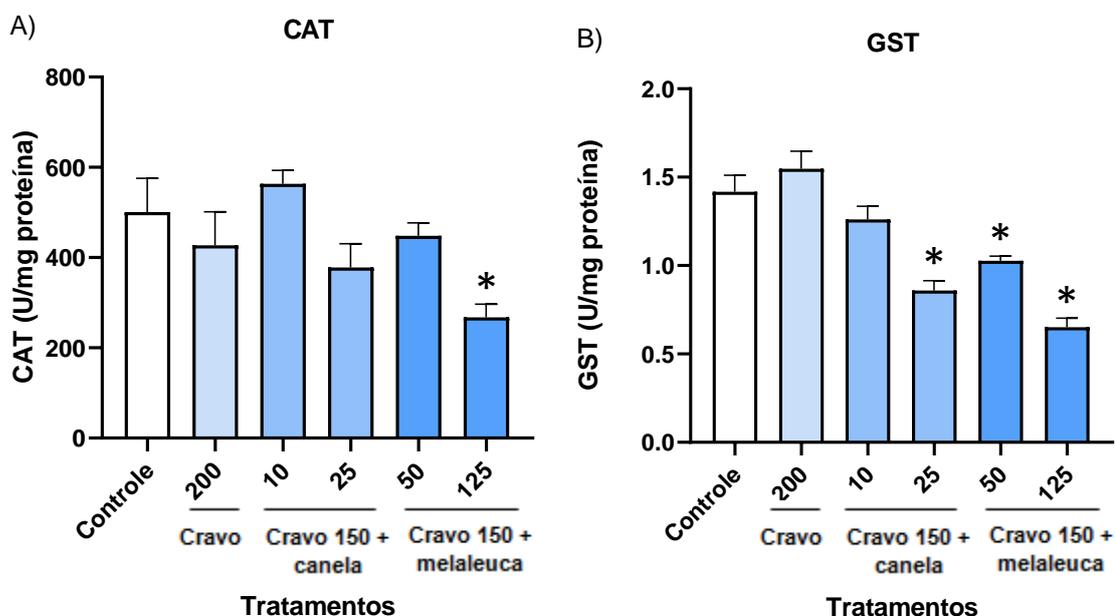


Figura 6. [A] Índice de danos (ID) nas células após o ensaio cometa. Os dados são apresentados como média e erro padrão. [B] Frequência de micronúcleo nas células dos peixes anestesiados com óleos essenciais combinados ($\mu\text{L/L}$). Os resultados são expressos em mediana e erro padrão da frequência (%₀) de micronúcleos. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.7 Análise da atividade de enzimas antioxidantes

A Figura 7A apresenta os resultados da atividade da catalase do experimento 2. Apenas o tratamento com a combinação de óleo de cravo e melaleuca de 125 $\mu\text{L/L}$ apresentou uma inibição da atividade da catalase ($267,54 \pm 25,52$ U/mg

proteína) ($p = 0,028$) em relação ao controle ($500,70 \pm 70,14$ U/mg proteína). A Figura 7B apresenta os resultados da atividade da enzima GST, entre os tratamentos, os grupos contendo óleo essencial de cravo e canela $25 \mu\text{L/L}$ ($0,86 \pm 0,05$ U/mg proteína) ($p < 0,001$), cravo e melaleuca $50 \mu\text{L/L}$ ($1,03 \pm 0,026$ U/mg proteína) ($p = 0,003$) e em $125 \mu\text{L/L}$ ($0,65 \pm 0,05$ U/mg proteína) ($p < 0,001$) tiveram uma diminuição da sua atividade quando comparada ao controle ($1,42 \pm 0,09$ U/mg proteína). Os demais tratamentos foram semelhantes ao controle. A Figura 7C apresenta os resultados da enzima SOD. Apenas o tratamento com o óleo essencial de cravo $200 \mu\text{L/L}$ ($275,40 \pm 28,37$ U/min/mg proteína) aumentou sua atividade de SOD significativamente ($p < 0,001$) quando comparado ao controle ($95,50 \pm 10,87$ U/min/mg proteína). Os demais resultados mantiveram-se semelhantes ao controle.



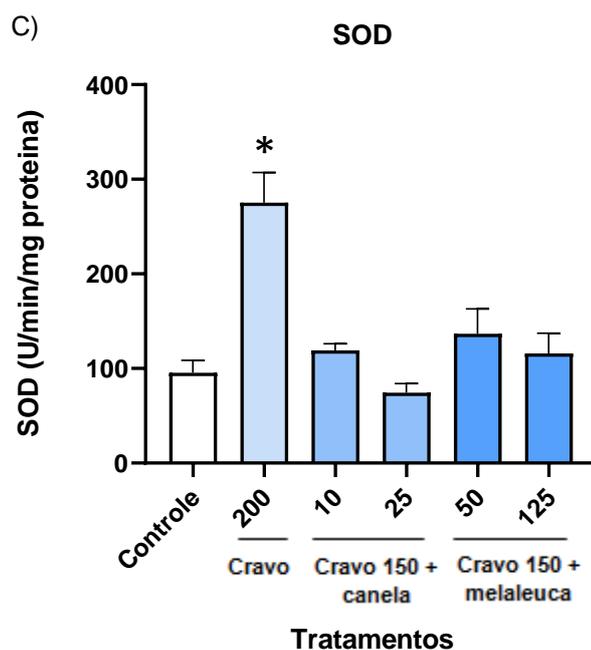


Figura 7. Atividade da enzima catalase [A], glutationa S-transferase [B] e superóxido dismutase [C] no fígado de *O. niloticus* após anestesia com óleos essenciais combinados ($\mu\text{L/L}$). Os resultados estão apresentados em médias e erro padrão. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.8 Análise molecular

A Figura 8A apresenta os resultados da expressão gênica relativa de *cat*, onde apenas o tratamento com o óleo de cravo e canela $10 \mu\text{L/L}$ se manteve semelhante ao controle ($p > 0,05$). O tratamento com óleo de cravo de $200 \mu\text{L/L}$ induziu uma regulação negativa de -2,1 vezes na expressão de *cat* em relação ao controle ($p = 0,003$). O mesmo aconteceu com os óleos combinados com cravo e canela $25 \mu\text{L/L}$ e cravo e melaleuca 50 e $125 \mu\text{L/L}$, com uma regulação negativa de -4,4, -2,3 e -2,8 vezes em relação ao controle, respectivamente. Todos estes resultados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$). A Figura 8B se refere à expressão gênica de *gst*. Os tratamentos com óleo de cravo e canela $25 \mu\text{L/L}$ e cravo e melaleuca 50 e $125 \mu\text{L/L}$, apresentaram uma regulação negativa de -9,5, -4,6 e -4,7 vezes, respectivamente, em relação ao controle ($p < 0,001$). A Figura 8C apresenta os resultados da expressão do gene de *sod*. Apenas o tratamento do óleo de cravo e canela $10 \mu\text{L/L}$ levou à uma diferença significativa na expressão da enzima ($p < 0,001$) com uma regulação positiva de +2,2 vezes em relação ao

controle. Todos os demais tratamentos se mantiveram com os valores semelhantes ao controle.

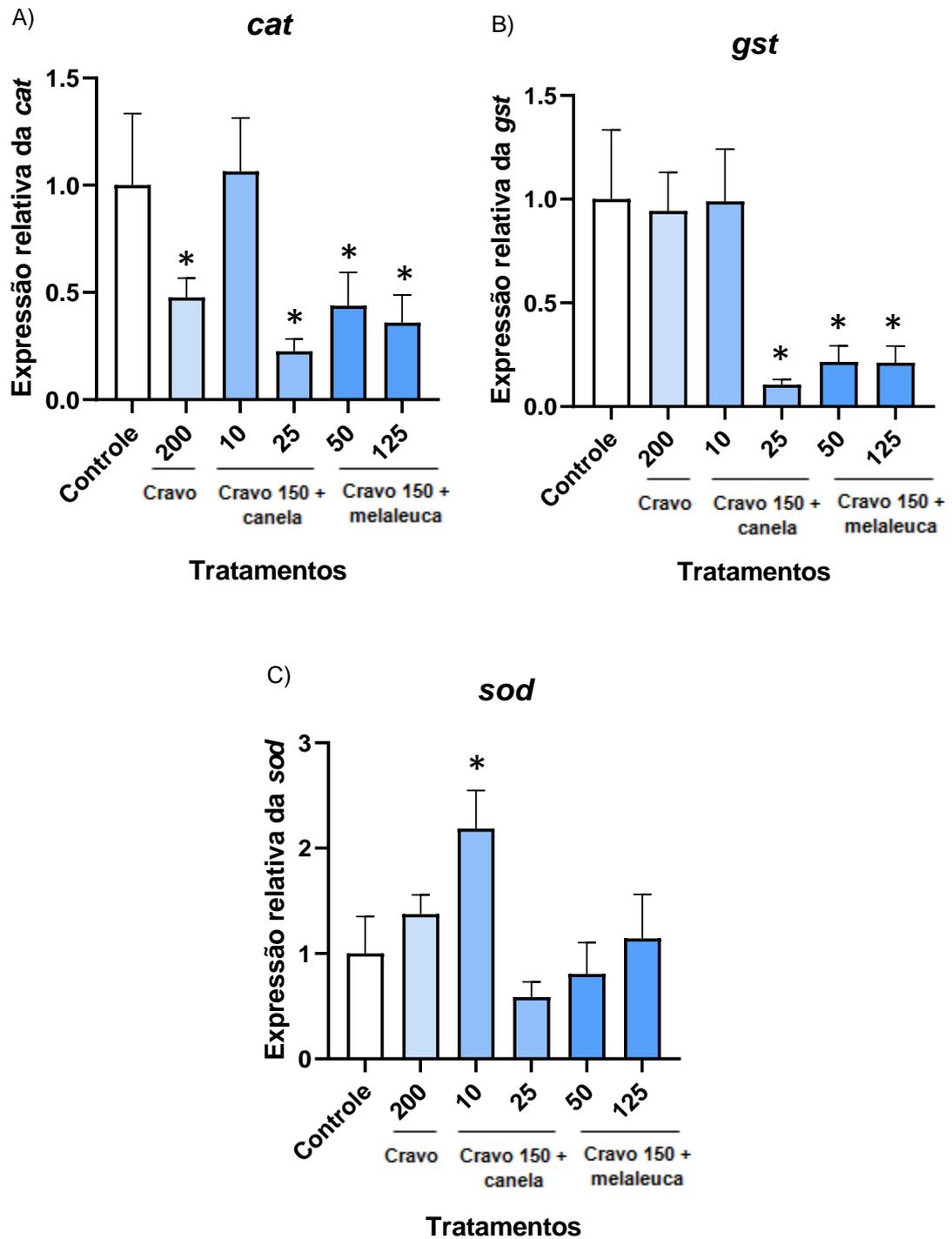


Figura 8. Expressão gênica relativa da catalase [A], glutationa S- transferase [B] e superóxido dismutase [C] em amostras de fígado de *O. niloticus* anestesiados com d

óleos essenciais combinados ($\mu\text{L/L}$). Os dados são apresentados como média e erro padrão. Asterísco (*) indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que todos os óleos testados tiveram atividade sedativa em baixas concentrações e ação anestésica nas concentrações mais altas. O óleo de cravo foi genotóxico na concentração de 200 µL/L apresentando um índice de danos do DNA elevado no ensaio cometa, entretanto foi o óleo que levou menos tempo para anestésiar os animais do primeiro experimento, ou seja, o mais eficaz como anestésico. A combinação dos óleos de canela e melaleuca com o óleo de cravo (150 µL/L) fez com que todos os animais atingissem o último estágio de anestesia e não fosse genotóxico.

De acordo com Hammer e colaboradores (2006), os valores de CL50 >100 mg/L são não tóxicos, dentro desse valor se enquadram os compostos γ-terpineno (DL50 > 2.000 mg/kg), 1,8-cineol e linalool (Tabela 1). O eugenol é classificado como levemente tóxico (CL50 10 - 100 mg/L). O terpinen-4-ol varia de moderado à pouco tóxico (DL50 200 - 2.000 mg/kg e >2000 mg/Kg, respectivamente) (BRASIL, 1992). Os compostos classificados como moderadamente tóxicos são: isoeugenol, α-terpineol e cinamaldeído (Hammer et al., 2006),. Nota-se que os dois compostos majoritários do cravo-da-índia estão classificados como moderado e levemente tóxicos, elucidando os resultados genotóxicos na concentração alta (200 µL/L). O Tween® 20, utilizado como dispersante, não influencia na toxicidade dos óleos, uma vez que é classificado como não tóxico (Tabela 1).

Os efeitos sedativos e anestésicos da melaleuca foram descritos anteriormente em carpas comuns (*Cyprinus carpio*) em 200 a 600 µL/L (Hajek, 2010). Souza e colaboradores (2018) também observaram que o óleo de melaleuca de 500 µL/L é a concentração ideal para a espécie *Rhamdia quelen*, levando menos de 10 min para a recuperação, assim como neste trabalho, e 3 min para a anestesia. Além disso, a melaleuca tem sido amplamente utilizada como agente antimicrobiano e antiinflamatório. O amplo espectro dessas atividades é atribuído principalmente ao terpinen-4-ol e 1,8-cineol, os principais componentes de seu óleo essencial (Baldissera et al., 2014). Estudos demonstraram que o efeito anestésico da melaleuca é devido ao seu composto prioritário terpinen-4-ol, que tem função sedativa e atividade antioxidante reduzindo os níveis de peroxidação lipídica em *Rhamdia quelen* (Souza et al., 2018). Por outro lado, pouco se sabe sobre o

mecanismo de anestesia dos óleos/extratos essenciais ou de seus compostos bioativos (Hoseini et al., 2018). O que se sabe é que geralmente os anestésicos causam depressão do sistema nervoso central ao interromper o potencial de ação dos axônios, liberação de neurotransmissores, excitabilidade da membrana ou uma combinação de todas essas ações (Ross, Ross, 2008)

A indução de anestesia em tempos curtos da canela foi estudada por Golomazou e colaboradores (2016), que demonstraram a sua ação anestésica em 7,5 min na concentração de 50 µL/L em dourada (*Sparus aurata L.*). Entretanto, neste trabalho foi necessária uma concentração de 100 µL/L para o animal atingir o último estágio da anestesia. A diferença de espécies, tamanho do animal, idade, sexo, além de fatores ambientais como a temperatura da água, podem influenciar na eficácia dos anestésicos (Ribeiro et al, 2015). A canela (*C. zeylanicum*) possui em sua grande maioria os compostos cinamaldeído, eugenol e linalol que representam cerca de ~85% da composição total do óleo (Kumar et al., 2016).

Diferentemente da canela, o óleo de cravo já foi muito utilizado e estudado como anestésico em aquicultura. A dosagem ideal de óleo de cravo para induzir a anestesia varia entre 50 e 100 mg/L ou ppm em diversas espécies de peixes (Javahery et al., 2012). Igualmente ao óleo de canela, foi necessária uma concentração maior para as espécies de *O. niloticus* aqui trabalhadas (200 µL/L). Tanto para o óleo de cravo quanto para outros anestésicos, essa diferença de concentração provavelmente está relacionada ao metabolismo da espécie de peixe em particular, entre outros fatores já citados (Simões et al., 2010). Os ingredientes ativos presentes no óleo de cravo-da-índia são eugenol (4-alil-2-metoxifenol) e iso-eugenol (4-propenil-2-metoxifenol), que correspondem a 90-95% do óleo em peso (Javahery et al., 2012). O eugenol é bastante conhecido e utilizado em aquicultura por sua ação analgésica (Javahery et al., 2012). Além disso, ele possui efeitos antiinflamatórios, antibacterianos e neuroprotetores (Meyer, Fish, 2008).

Uma combinação de ensaio cometa e teste de micronúcleo é reconhecida internacionalmente como as melhores análises para avaliar o potencial genotóxico devido à maior sensibilidade e capacidade de detectar quebras de fita simples ou dupla de DNA e mutações cromossômicas, respectivamente (Araldi et al., 2015; Kampke et al., 2018). Com uma concentração de 60 mg/L em *O. niloticus*, o eugenol

mostrou efeitos significativos tanto no índice de mutagenicidade (aumento na frequência de MN) quanto no índice de genotoxicidade (aumento na frequência de anormalidades nucleares) (Nascimento et al., 2020). De acordo com Shoeibie colaboradores (2009) o efeito mutagênico do óleo de cravo é dose-dependente. No presente trabalho apenas a concentração de 200 µL/L do cravo causou genotoxicidade através do ensaio cometa, sendo que as demais concentrações e os outros óleos não causaram esse efeito tóxico. Quando se adicionou o óleo de melaleuca e o de canela ao óleo de cravo 150 µL/L, todas as proporções foram protetivas ao dano do DNA, pois os valores do índice de danos (ID), através do ensaio cometa, foram menores comparado ao valor do controle, sugerindo que tenham ação anti-genotóxica. Essa ideia é corroborada por Golomazou e colaboradores (2016), que demonstraram que o cravo-da-índia (*E. aromatica*) na concentração de 50 µL/L induz genotoxicidade em dourada (*Sparus aurata* L.). Nesse mesmo estudo a canela (*C. zeylanicum*) foi avaliada como agente anestésico antiestresse e genoprotetor (50 µL/L), e melaleuca (*M. alternifolia*) foi classificada como anti-genotóxica na concentração de 200 µL/L (Golomazou et al., 2016).

O fígado é o órgão mais utilizado para análise enzimática, visto que é responsável pela desintoxicação do organismo (Teles et al., 2019). A expressão gênica representa o primeiro nível de interação entre um agente estressor e o genoma, que através da síntese de proteínas conduz a resposta do organismo às mudanças externas (Brulle et al., 2008). A catalase (CAT) funciona como um antioxidante e é responsável por degradar o peróxido de hidrogênio, uma vez que esse composto é bastante tóxico para o organismo (Souza, 2010). Embora os tratamentos com óleo de canela (75 e 100 µL/L) no experimento 1 mantiveram a atividade enzimática da CAT semelhante ao controle, houve um aumento da expressão do gene *cat*. No experimento 2 houve uma diminuição da expressão de *cat* nos tratamentos com cravo de 200 µL/L, cravo e canela 25 µL/L, cravo e melaleuca 50 e 125 µL/L. Os mesmos tratamentos que diminuíram a expressão de *cat*, também diminuíram a atividade enzimática da CAT, entretanto apenas o tratamento com cravo e malaleuca de 125 µL/L obteve uma diminuição significativa. Essas respostas dos biomarcadores moleculares são consideradas intermediárias entre as fontes de estresse e os efeitos de nível superior, sendo assim os genes

terão respostas mais rápidas (e precoce) do que as atividades enzimáticas (Van der Oost et al., 2003; Lee et al., 2015).

A GST é uma das principais enzimas de desintoxicação do organismo (Mohamed et al., 2020). No experimento 1 a expressão do gene *gst* foi reduzida significativamente das concentrações mais altas de cravo (150 e 200 $\mu\text{L/L}$), e no tratamento com o óleo de melaleuca na concentração mais baixa (450 $\mu\text{L/L}$). Os tratamentos que diminuíram a expressão de *gst* também diminuíram a atividade enzimática da GST. Já no experimento 2, apenas os grupos com óleo de cravo e canela 25 $\mu\text{L/L}$, cravo e melaleuca 50 e 125 $\mu\text{L/L}$ apresentaram uma diminuição na expressão de *gst*. Esses mesmos tratamentos obtiveram uma diminuição significativa da atividade enzimática da GST. A diminuição da atividade enzimática sugere ser um indicativo de aumento dos níveis de oxidantes, superando a capacidade das enzimas de neutralizar a produção de EROs (Salbego et al., 2014). Foram estudadas as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{L/L}$ de óleo de melaleuca em jundiá por 6 h, a atividade da CAT e da GST não se alteraram no fígado do animal após esse tempo (Souza et al., 2018).

A superóxido dismutase (SOD) protege as células do ânion superóxido, catalisando-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio, cujos compostos são mais fáceis de serem eliminados dos organismos (Maia et al., 2012). Não houve diferenças significativas de expressão do gene *sod* no experimento 1, assim como a sua atividade enzimática (SOD). O grupo tratado com cravo e canela 10 $\mu\text{L/L}$ foi o único do experimento 2 a apresentar expressão significativamente maior desse gene. Apesar do aumento da atividade enzimática da SOD nesse tratamento, a diferença não foi significativa. Zahran e colaboradores (2021), utilizaram 30 mg/L de eugenol em tempos de 5 à 20 min em tilápia do Nilo e observaram uma diminuição da enzima CAT significativamente diferente em relação ao nível basal, enquanto os níveis da SOD se mantiveram semelhantes ao do controle. Esse desequilíbrio entre a concentração de pró-oxidantes e antioxidantes em um organismo submetido a estressores bióticos ou abióticos é conhecido por provocar uma resposta ao estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010).

8. CONCLUSÃO

A partir desse trabalho é possível concluir que todos os óleos utilizados, cravo-da-índia, melaleuca e canela, tiveram efeito sedativo em baixas concentrações e efeito anestésico em altas concentrações em exemplares de *O. niloticus*. Apesar de descobrir que o óleo de cravo em concentrações altas é altamente eficaz como anestésico, ele também causa genotoxicidade à espécie estudada. Adicionar 10% e 25% dos óleos de melaleuca ou canela, que não são genotóxicos, a uma concentração mais baixa do óleo de cravo, foi um meio de contornar o fator da genotoxicidade e manter sua eficácia como anestésico. Entretanto, tanto na utilização dos óleos individuais quanto nos óleos combinados obtivemos alterações nas regulações das expressões dos genes (*cat*, *sod* e *gst*) e nas enzimas de estresse oxidativo (CAT, SOD E GST). Recomendá-se o uso do óleo combinado na menor proporção (10%) de cravo (150 µL/L) e melaleuca (50 µL/L), pois foi eficaz como anestésico, o índice de mortalidade foi nulo e não apresentou genotoxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelkhalek, N. K., Risha, E., El-Adl, M. A., Salama, M. F., & Dawood, M. A. O. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. *Fish & Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2020.05.064
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Alves, D. da N., Martins, R. X., Ferreira, E. dos S., Alves, A. F., Andrade, J. C. de, Batista, T. M., Lazarini, J. G., Amorim, L. S., Rosalen, P. L., Farias, D. F., Castro, R. D. de. 2021. Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An In Vivo Study. *BioMed Research International* / v. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2305695>
- Anderson, W.G.; McKinlay, R.S.; Colavecchia, M. (1997). The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17: 301– 307. [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(1997\)017<0301:TUOCOA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1997)017<0301:TUOCOA>2.3.CO;2)
- APHA - American Public Health Association (2005). *Standard Methods: For the examination of water & wastewater. Centennial Edition. 21st Edition.*
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., et al. de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004
- Associação Brasileira da Piscicultura. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/>> Acesso em: 20 de setembro de 2021.
- Ayroza, L. M. da S. (2009). Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR. Tese de doutorado no programa de pós-graduação em aquicultura. Universidade Estadual Paulista. Centro de Aquicultura da UNESP. SP - Jaboticabal.

- Bahrekazemi, M., Yousefi, N. (2017). Plasma enzymatic, biochemical and hormonal responses to clove oil, 2-phenoxy ethanol, and MS-222 exposed to Caspian brown trout (*Salmo truttacaspus, kessleri*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 3(1), 47–60. DOI: 10.18869 / acadpub.ijaah.3.1.47
- Baldissera, M. D., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Vaucher, R. A., Santos, R. C. V., Duarte, T., et al. Monteiro, S. G. (2014). Effect of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the longevity and immune response of rats infected by *Trypanosoma evansi*. Research in Veterinary Science, 96(3), 501–506. doi:10.1016/j.rvsc.2014.03.013
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, 23(4), 629–643. doi:10.1590/s1415-52732010000400013
- Belema, M., Idowu, K. O., Aghogho, K. D., Ndubuisi, A., Oluwakemi, A., Stella, U. (2017). Handling and packaging of ornamental fishes for successful transportation. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 5(5), 263–265.
- Boaventura, T. P., Souza, C. F., Ferreira, A. L., Favero, G. C., Baldissera, M. D., Heinzmann, B. M., et al. Luz, R. K. (2020). Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753) as anesthetic for *Lophiosilurus alexandri*: Induction, recovery, hematology, biochemistry and oxidative stress. Aquaculture, 735676. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735676
- Bodur, T., Afonso, J. M., Montero, D., Navarro, A. (2018). Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus labrax* and *Argyrosomus regius*. Aquaculture, v. 482, p. 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.029>
- Bodur, T., León-Bernabeu, S., Navarro, A., Tort, L., Afonso, J. M., Montero, D. (2018). Effects of new plant based anesthetics *Origanum sp.* and *Eucalyptus sp.* oils on stress and welfare parameters in *Dicentrarchus labrax* and their comparison with clove oil. Aquaculture, 495, 402–408. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.021
- Borges, A. M. Criação de tilápias. 2. ed. Brasília, DF: EMATER-DF, 2009.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3 de 16 de janeiro de 1992. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html> Acesso em: 25 de fevereiro de 2022.

Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., & Vandenbulcke, F. (2008). Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1441–1453. doi:10.1016/j.dci.2008.06.009

Bullangpoti, V., Mujchariyakul, W., Laksanavilat, N., Junhirun, P. (2018). Acute toxicity of essential oil compounds (thymol and 1,8-cineole) to insectivorous guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. *Agriculture and Natural Resources*. doi:10.1016/j.anres.2018.06.011

Clearwater, S.; Martin, M.; Golding, L.; Macaskill, B.; Phillips, N. 2005. Toxicity testing of isoeugenol (CAS 97-54-1), the active ingredient in AQUI-S, on *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Oncorhynchus mykiss*. NIWA Client Report HAM2004- 120. National Institute of Water and Atmospheric Research, Hamilton. 87p

Cogo, A. J. D., Siqueira, A. F., Ramos, A. C., Cruz, Z. M. A., Silva, A. G. (2009). Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza online* v. 7, n. 1, p. 37–42.

Correia, A. M., Pedrazzani, A. S., Mendonça, R. C., Massucatto, A., Ozório, R. A., Tsuzuki, M. Y. (2017). Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). *Braz. J. Biol.* vol.78 no.3. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.166695>

Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus Aurata* L.). *Veterinary*

Immunology and Immunopathology. V. 101, p. 203-210.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.021>

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em:
<<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>> Acesso em: 20 de abril de 2020.

FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i9540es/l9540ES.pdf>> Acesso em: 05 de outubro de 2021.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Flohé, L., Otting, F. (1984). Superoxide Dismutase assay. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-125. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05013-8

Food and Cosmetics Toxicology, 14(875). 1976. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7461#section=Toxicity>> Acesso em: 28 de fevereiro de 2022.

Golomazou, E., Malandrakis, E. E., Kavouras, M., Karatzinos, T., Miliou, H., Exadactylos, A., Panagiotaki, P. 2016. Anaesthetic and genotoxic effect of medicinal plant extracts in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 464, 673–682. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.08.017

Gontijo, Á.M.M.C., Barreto, R.E., Speit, G., Valenzuela Reyes, V. A., Volpato, G. L., Favero Salvadori, D.M. (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), p. 165–172. doi:10.1016/s1383-5718(02)00276-0

Grazeffe, V. S., Tallarico, L. de F., Pinheiro, A. de S., Kawano, T., Suzuki, M. F., Okazaki, K., Pereira, C.A.B., Nakano, E. (2008). Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 654(1), p. 58-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.007>

Grush, J., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D. (2004). The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1), 46–53. doi:10.1089/154585404774101671

Grush, J., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D. (2004). The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1), 46–53. doi:10.1089/154585404774101671

Guénette, S. A., Uhland, F. C., Hélie, P., Beaudry, F., Vachon, P. (2007). Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 266(1-4), 262–265. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.046

Habig, W.H., Jakoby, M.J. (1981). Assays for differentiation of glutathione s-transferases. *Methods in Enzymology*, 77: 398 -405.

Habig, W.H., Pabts, M.J. Jakoby, W.B., (1997). Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal Biological Chemistry*, v. 249, p. 7130-7139.

Hajek, G. J. (2010). The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 42(2), 296–300. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02625.x

Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., Nielsen, J. B. (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44(5), 616–625. doi:10.1016/j.fct.2005.09.001

Hashimoto, G. S. O., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450: 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>

Hayashi, M., Macgregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., e Sutou, S. (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, p. 234-252. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<234::AID-EM10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<234::AID-EM10>3.0.CO;2-L)

Hikasa, Y.; Takase, K.; Ogasawara, T.; Ogasawara, S.; Ogasawara, T.; Ogasawara, S. (1986) Anaesthesia and recovery with tricain methansulfonate, eugenol and thiopental sodium in carp, *Cyprinus carpio*. *Jpn J Sci* 48(2):341–351. 10.1292/jvms1939.48.341

Hill, J. V.; Davison, W.; Forster, M. E. (2002). The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heartventricle, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol Biochem* 27:19–28. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000021742.30567.2d>

Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., & Yousefi, M. (2018). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. doi:10.1111/raq.12245

Huber, P. C., Almeida, W. P., Fátima, Â. de. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170–1179. doi:10.1590/s0100-40422008000500046

Javahery, S., Nekoubin, H., Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1545–1552. doi:10.1007/s10695-012-9682-5

Kampke, E. H., de Souza Barroso, M. E., Marques, F. M., Fronza, M., Scherer, R., Lemos, M. F., et al. Gomes, L. C. (2018). Genotoxic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil on fish (*Oreochromis niloticus*) and mammal (*Mus musculus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, 163–171. doi:10.1016/j.etap.2018.03.016

Keene, J.L.; Noakes, D.L.G.; Moccia, R.D.; Soto, C.G. (1998) The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquat Res* 29:89–101. 10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x

Kerrola, K.; Galambosi, B.; Kallio, H. 1994. Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinales* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 776-781.

Kizak, V., Can, E., Danabaş, D., Can, Ş. S. 2018. Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius*

auratus). Aquaculture, v. 493, p. 296-301.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.013>

Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., Anderson, J. L. 2015. Fishto 2030: The Role and Opportunity for Aquaculture. Aquaculture Economics & Management, 19:3, 282-300.
<http://dx.doi.org/10.1080/13657305.2015.994240>

Kumar, V., Marković, T., Emerald, M., Dey, A. (2016). Herbs: Composition and Dietary Importance. Encyclopedia of Food and Health, 332–337. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00376-7

Lambooi, B., Pilarczyk, M., Bialowas, H., Reimert, H., Andre, G., Van de Vis, H. (2009). Anaesthetic properties of Propiscin (Etomidat) and 2-phenoxyethanol in the common carp (*Cyprinus carpio L.*), neural and behavioural measures. Aquacult Res 40:1328–1333 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02233.x>

Lee, J. W., Won, E.J., Raisuddin, S., Lee, J.S. (2015). Significance of adverse outcome pathways in biomarker-based environmental risk assessment in aquatic organisms. Journal of Environmental Sciences, 35, 115–127. doi:10.1016/j.jes.2015.05.002

Lewis, R.J. Sr. (ed) Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 11th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 2004., p. 3363

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, Methods 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Maia, J. M., Silva, S. L. F., Voigt, E. L., Macêdo, C. E. C. de, Ponte, L. F. A., Silveira, J. A. G. (2012). Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. Acta Botanica Brasilica, Bahia, n.26, v.2, p.342-349. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000200010>

Martins, T., Diniz, E., Félix, L. M., Antunes, L. (2018). Evaluation of anaesthetic protocols for laboratory adult zebrafish (*Daniorerio*). PLOS ONE, 13(5), e0197846. doi:10.1371/journal.pone.0197846

Martins, T., Valentim, A., Pereira, N., Antunes, L. M. (2018). Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. *Laboratory Animals*, 002367721881519. doi:10.1177/0023677218815199

Matulovic, F. M., Oshiro, L. M. Y. (2016). Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, v. 14, p. 57-68. <http://dx.doi.org/10.7213/academica.14.2016.06>

Meyer, R. E., Fish, R. E. (2008). Pharmacology of Injectable Anesthetics, Sedatives, and Tranquilizers. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, 27–82. doi:10.1016/b978-012373898-1.50006-1

Mohamed, A. A.-R., El-Houseiny, W., EL-Murr, A. E., Ebraheim, L. L. M., Ahmed, A. I., El-Hakim, Y. M. A. (2020). Effect of hexavalent chromium exposure on the liver and kidney tissues related to the expression of CYP450 and GST genes of *Oreochromis niloticus* fish: Role of curcumin supplemented diet. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109890. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109890

Nascimento, H. dos S., Crispim, B. do A., Francisco, L. F. V., Merey, F. M., Kummrow, F., Viana, L. F., et al. Barufatti, A. (2020). Genotoxicity evaluation of three anesthetics commonly employed in aquaculture using *Oreochromis niloticus* and *Astyanax lacustris*. *Aquaculture Reports*, 17, 100357. doi:10.1016/j.aqrep.2020.100357

Oliveira, F. A., Morais, T. P., Grassi, L. E. A. (2018). Evaluation of genotoxic effects and differential counting of the white cells in individuals of *Astyanax bimaculatus* (*Pices: Characidae*) exposed to different environmental conditions. *Ambiência Guarapuava (PR)* v.14 n.3 p. 614 - 631. 10.5935/ambiencia.2018.03.13

Ono, E. A.; Kubitz, F. (2003). *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono, 2003. 112p.

Opdyke, D.L.J. (ed.). *Monographs on Fragrance Raw Materials*. New York: Pergamon Press, 1979., p. 695

Ortuno, J., Esteban, M. A., Meseguer, J. (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 12:49–59. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0353>

Pattanasiri, T., Taparhudee, W., Suppakul, P. (2016). Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquaculture International*, 25(1), 163–175. doi:10.1007/s10499-016-0020-2

Phan, V. N., Gomes, V., Passos, M. J. A. C. R., Rochad, A. J. S. (2015). In vivo micronucleus test for detecting response of teleost fish to environmental genotoxic exposure. *Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans*, p. 175.

Possamai, F. P. (2009). Análise do estresse oxidativo em trabalhadores expostos à emissão de contaminantes atmosféricos de incinerador de resíduos sólidos de serviço de saúde, antes e após a suplementação antioxidante. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em farmácia - PGFAR. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

Priborsky, J.; Stara, A.; Rezabek, J.; Zuskova, E.; Lepic, P.; Velisek, J. (2015). Comparison of the effect of four anaesthetics on haematological profiles, oxidative stress and antioxidant enzymes in barbel (*Barbus barbus*). *Neuroendocrinol Lett* 2015; 36(Suppl. 1):141–146.

Pubchem. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em: 28 de fevereiro de 2022.

Purbosari, N., Warsiki, E., Syamsu, K., Santoso, J. (2019). Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. *Aquaculture and Fisheries* 4, p. 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.03.002>

Readman, G. D., Owen, S. F., Knowles, T. G., & Murrell, J. C. (2017). Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-06917-2

Ribeiro, P.A.P.; Miranda-Filho, K.C.; de Melo, D.C.; Luz, R.K. (2015) Efficiency of eugenol as anesthetic for the early life stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Agrarian Sciences. An. Acad. Bras. Ciênc. 87 (01). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140024>

Ross, L. G. Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell Science, Oxford, U.K. p. 236.

Salbego, J., Becker, A. G., Gonçalves, J. F., Menezes, C. C., Heldwein, C. G., Spanevello, R. M., et al. Baldisserotto, B. (2014). The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotropical Ichthyology*, 12(4), 811–818. doi:10.1590/1982-0224-20130178

Sánchez-Muros, M. J., Sánchez, B., Barroso, F. G., Toniolo, M., Trenzado, C. E., Rus, A. S. (2017). Effects of rearing conditions on behavioural responses, social kinetics and physiological parameters in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Appl Anim Behav Sci*. 197:120–8. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.08.004>

Santos, E. L. R., Rezende, F. P., Moron, S. E. (2020). Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. *Aquaculture*, 523. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735164

Santos, M. dos, W., S. de Brito, T., de A. Prado, S., G. de Oliveira, C., C. De Paula, A., C. de Melo, D., A.P. Ribeiro, P. (2016). Cinnamon (*Cinnamomum sp.*) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 551–555. doi:10.1016/j.fsi.2016.04.135

Schreck, C. B., Tort, L. (2016). “The concept of stress in fish,” in *Biology of Stress in Fish - Fish Physiology*, Vol. 35, eds C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell, and C. J. Brauner (Cambridge, MA: Academic Press) 1–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>

Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., et al. (2012). Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 85–105. doi: 10.1007/s10695-011-9517-9

Shoeibi, S., Rahimifard, N., Pirouz, B., Yalfani, R., Pakzad, S.R., Mirab, S. (2009). Mutagenicity of four natural flavors: Clove, cinnamon, thyme and *Zataria multiflora* Boiss. *J. Med. Plant.* 8, 89-96.

SIGMA-ALDRICH. Material Safety Data Sheet. 2014. Disponível em: <<https://www.nwmissouri.edu/naturalsciences/sds/t/Tween%2020.pdf>> Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

Simões, L. N., Lombardi, D. C., Gomide, A. T. M., Gomes, L. C. (2011). Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (*Actinopterygii: Cichlidae*) juveniles. *Zoologia* (Curitiba, Impresso), 28(3), 285–290. doi:10.1590/s1984-46702011000300001

Singulani, J. L., Pedroso, R. S., Ribeiro, A. B., Nicolella, H. D., Freitas, K. S., Damasceno, J. L., et al. Pires, R. H. (2018). Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiology*. doi:10.2217/fmb-2018-0200

Skår, M. W., Haugland, G. T., Powell, M. D., Wergeland, H. I., Samuelsen, O. B. (2017). Development of anaesthetic protocols for lumpfish (*Cyclopterus lumpus L.*): Effect of anaesthetic concentrations, sea water temperature and bodyweight. *PLoS ONE* 12(7): e0179344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179344>

Slamenova, D., Horvathova, E. (2013). Cytotoxic, anti-carcinogenic and antioxidant properties of the most frequent plant volatiles. *Neoplasms*. 60, 343-354. DOI: 10.4149 / neo_2013_046

Small, B. C. (2003). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218(1-4), 177–185. doi:10.1016/s0044-8486(02)00302-2

Soto, C. G., Burhanuddin. (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136(1-2), 149–152. doi:10.1016/0044-8486(95)01051-3

Souza, C. F., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M. (2019). Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. *Front. Physiol.* 10:785. doi: 10.3389/fphys.2019.00785

Souza, C. F., Baldissera, M. D., Silva, L. de L., Geihs, M. A., Baldisserotto, B. (2018). Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic

and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish? *Aquaculture*, 486, 217–223. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.12.025

Souza, K. R. D. de. (2010). Desenvolvimento de aerênquima e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Souza, M.L.R. de; Maranhão, T.C.F. (2001). Rendimento da carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal. *Acta Scientiarum*, v.23, p.897-901. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v23i0.2643>

Speit, G., Vasquez, M., Hartmann, A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell geno toxicity. *Mutation Research*, v. 681, p. 3–12, 2009. 10.1016 / j.mrrev.2008.03.005

Stroh, J., Wan, M.T., Isman, M.B., Moul, D.J., 1998. Evaluation of acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 923–930.

Suares Rocha, P., Deutschmann, B., Hollert, H. (2019). In Situ Determination of Genotoxic Effects in Fish Erythrocytes Using Comet and Micronucleus Assays. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. doi:10.1007/7653_2019_40

Teixeira, R. R., Souza, R. C., Sena, A. C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Couto, R. D. (2017). Essential oil of *Aloysia triphylla* in *Nile tilapia*: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Research* 48: 3383–3392. <https://doi.org/10.1111/are.13165>

Teixeira, R.R., Souza, R.C., Sena, A.C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Copatti, C.E.. (2018). Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in Nile tilapia transport. *Bol. Inst. Pesca* 44 (1), 17-24. doi: 10.20950/1678-2305.2018.263.

Teles, M.; Oliveira, M.; Jerez-Cepa, I.; Franco-Martínez, L.; Tvarijonaviciute, A.; Tort, L.; Mancera, J.M. (2019) Transport and Recovery of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Sedated With Clove Oil and MS222: Effects on Oxidative Stress Status. *Front. Physiol.* 10:523. doi: 10.3389/fphys.2019.00523

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3), p. 206-21. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j

Uehara, S.A., Andrade, D.R., Takata, R., Gomes-Júnior, A.V., Vidal, M.V. (2019). The effectiveness of tricaine, benzocaine, cloveoil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.054>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C, Remm, M., Rozen, S.G., (2012). Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*. 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. doi:10.1016/s1382-6689(02)00126-6

Velíšek, J.; Własow, T.; Gomulka, P.; Svobodová, Z.; Novotný, L., Ziomek, E. (2006). Effects of Clove Oil Anaesthesia on European Catfish (*Silurus glanis* L.). *Acta Vet. Brno* 2006, 75: 99-106. <https://doi.org/10.2754/avb200675010099>

Vidal, L.V.O.; Furuya, W.M.; Graciano, T.S.; Schamber, C.R.; Silva, L.C.R. da; Santos, L.D. dos; Souza, S.R. de. 2007. Toxicidade aguda do eugenol para juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). 1º congresso Brasileiro de produção de peixes nativos de água doce. Mato Grosso do Sul. Universidade Estadual de Maringá. Maringá - PR.

Waterstrat, P. R. (1999). Induction and Recovery from Anesthesia in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Fingerlings Exposed to Clove Oil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), 250–255. doi:10.1111/j.1749-7345.1999.tb00872.x

Woody, C.A., Nellson, J., Ramstad, K. (2002) Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J Fish Biol* 60:340–347

Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y.B., Lee, C.H., Park, K., Kim, J.S., Oh, S.B. (2003). Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J. Dent. Res.* 82, 781–785. doi: 10.1177/154405910308201004.

- Yousefi, M., Hoseini, S. M., Vatnikov, Y. A., Nikishov, A. A., & Kulikov, E. V. (2018). Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. *Aquaculture*, 495, 376–383. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.022
- Yuan, W., Lee, H. W., Yuk, H.-G. (2017). Antimicrobial efficacy of *Cinnamomum javanicum* plant extract against *Listeria monocytogenes* and its application potential with smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 260, 42–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.015
- Zahl, I. H., Samuelsen, O., Kiessling, A. (2011). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 201–218. doi:10.1007/s10695-011-9565-1
- Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O. B., Olsen, R. E. (2010). Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol Biochem* 36, 719–730. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9346-2>
- Zahran, E., Risha, E., Rizk, A. (2021). Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. *Aquaculture*, 534, 736251. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736251
- Zaniboni-Filho, E., Pedron, J. S., Ribolli, J. (2018). Oportunidades e desafios para a piscicultura em reservatórios brasileiros: uma revisão. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 30 , e. 302. Epub. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x12617>
- Zhou, H., Xiang, N., Xie, J., Diao, X. (2018). Ecotoxicology: The History and Present Direction. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. V. 1, p. 415-423. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.10888-7