

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

**RESPOSTAS DE ESTRESSE EM LAMBARI (*astyanax lacustris*)**  
**ANESTESIADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA**  
**(*Lippia alba*)**

**LUCIANO AMADEU REGINATO**

**VILA VELHA-ES**  
**SETEMBRO / 2022**

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

**RESPOSTAS DE ESTRESSE EM LAMBARI (*astyanax lacustris*)**  
**ANESTESIADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA**  
**(*Lippia alba*)**

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

**LUCIANO AMADEU REGINATO**

**VILA VELHA-ES**  
**SETEMBRO / 2022**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R333r Reginato, Luciano Amadeu.  
Respostas de estresse em lambari (*astyanax lacustris*)  
anestesiado com óleo essencial de erva cidreira (*lippia alba*) /  
Luciano Amadeu Reginato. – 2022.  
51 f. : il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.  
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Vila Velha, 2022.  
Inclui bibliografias.

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

CDD 615

**LUCIANO AMADEU REGINATO**

**RESPOSTAS DE ESTRESSE EM LAMBARI (*astyanax lacustris*)  
ANESTESIADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA  
(*Lippia alba*)**

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

Aprovada em 05 de setembro de 2022.

Banca Examinadora:



---

**Dr. Elisardo Corral Vasquez (UVV)**



---

**Dra. Julia Merçon Fernandes Moreira  
(Ambipar Response Analytics)**



---

**Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV)  
(Orientador)**

Dedicatória: Dedico este trabalho a Deus, que tudo tem me concedido durante todos estes anos de vida e de profissão.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço imensamente ao professor dr. Levy, pela paciência e por dividir comigo seu tempo e conhecimento, além de toda equipe de laboratório, especialmente Thathyana e Thais ao qual seria impossível a elaboração dos experimentos.

A professora Johara pela disposição e dedicação mesmo a distância me dando o suporte, a professora Christiane Vasconcelos, por todo conhecimento dividido comigo, pela paciência e por me ajudar imensamente nas análises estatísticas.

Ao professor Elisardo Corral Vasquez por todo conhecimento a mim repassado paciência, carinho e por me prestigiar na banca avaliadora.

Também agradeço a todos os colegas de turma pelo convívio e trocas de experiências.

A todos os professores e aos meus colegas enfermeiros de profissão pelas trocas de plantões, pelo incentivo, em especial para minha ex coordenado Leticia por permitir as trocas de plantão. A enfermeira Sara por sempre estar disposta a permutar sempre que eu precisei. A minha gerente Paula que sempre me liberou do trabalho para participar das aulas e até mesmo pelos experimentos em laboratório.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação  
GRATIDÃO.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>07</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>09</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 ANESTÉSICO EM PEIXES.....	12
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANESTÉSICOS PARA PEIXES .....	13
1.3 ESTRESSE EM PEIXES EXPOSTOS AOS ANESTÉSICOS.....	15
1.4 DISPERSANTES PARA ÓLEOS ESSENCIAIS .....	17
1.5 <i>Astyanax lacustris</i> (LAMBARI).....	18
1.6 HIPÓTESE.....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 OBJETIVOS GERAL .....	19
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	19
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	20
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	21
<b>4. ANÁLISE E RESULTADO .....</b>	<b>24</b>
4.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO EXPERIMENTO I.....	24
4.2 ANÁLISE BIOQUÍMICAS DO EXPERIMENTO I .....	28
4.3 ANÁLISE MOLECULARES E EXPRESSÃO GÉNICA DO EXPERIMENTO I .....	34
4.4 ANÁLISE DO EXPERIMENTO II .....	40
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Estágios de anestesia em peixes .....	15
Figura 1. Foto de <i>Astyanax lacustris</i> sob balança analítica. ....	18
Figura 2. Desenho do experimento I.....	21
Figura 3. Desenho do experimento II.....	22
Figura 4. Avaliação do estágio I de anestésias por tratamento.....	24
Figura 5. Avaliação do estágio II de anestésias por tratamento.....	25
Figura 6. Avaliação do estágio III de anestésias por tratamento.....	26
Figura 7. Avaliação da recuperação pós anestesia por tratamento.....	27
Tabela 2. Anova comparativa por tipo de tratamento.....	27
Figura 8. Valor médio da Glicose em cada tratamento.....	28
Figura 9. Apresentação do comportamento da glicose no modelo quadrático.....	20
Figura 10. Apresentação dos dados do valor da glicose por tipo de tratamento e grupo controle e suas médias de acordo com teste Duncan com $p < 0.05$ .....	30
Figura 11. Apresentação dos dados do valor da lactato por tipo de tratamento e grupo controle e suas médias de acordo com teste Duncan com $< 0,05$ .....	31
Figura 12. Apresentação dos dados do valor do cortisol por tipo de tratamento e grupo controle e suas médias de acordo com teste Duncan com $< 0,05$ .....	32
Tabela 3. ANOVA comparativo por tipos de tratamentos. Dados expressos em média e desvio padrão.....	33
Figura 13. Apresentação dos dados do valor da expressão gênica da Enzima HSP 70..	34
Figura 14. Grupo etanol tempo de 0 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	35
Figura 15. Grupo etanol tempo de 12 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	35
Figura 16. Grupo etanol tempo de 24 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	35
Figura 17. Grupo etanol tempo de 48 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	36
Figura 18. Grupo Tween tempo de 0 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	36
Figura 19. Grupo Tween tempo de 12 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	36
Figura 20. Grupo Tween tempo de 24 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	37

Figura 21. Grupo Tween tempo de 48 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	37
Figura 22. Grupo controle com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da <i>Astyanax lacustris</i> .....	37
Figura 23. Apresentação dos dados do valor da glicose por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 e 20 minutos e suas médias de acordo com teste Duncan com $P < 0,05$ .....	39
Figura 24. Apresentação dos dados do valor do lactato por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 e 20 minutos e suas médias de acordo com teste Duncan com $P < 0,05$ .....	40
Figura 24. Apresentação dos dados do valor do cortisol por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 e 20 minutos e suas médias de acordo com teste Duncan com $P < 0,05$ .....	41

## LISTA DE ABREVIACÕES

E – Etanol

ET - Etanol

EOLA – 3leo Essencial *Lippia Alba*

FDE - Food and Drug Administration

HHI - Hipot3lamo-hip3fise-interrenais

LA – *Lippia Alba*

MS 222 - tric3ina metanosulfonato

OL – 3leo essencial

T20 – Tween 20

T. Tween 20

TT. Twenn 20

U.S – Unid States.

## RESUMO

REGINATO, LUCIANO AMADEU. M. CF, Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2022. **Respostas de estresse em lambari (*astyanax lacustris*) anestesiado com óleo essencial de erva cidreira (*lippia alba*)**. Orientador: Dr. Levy de Carvalho Gomes.

O transporte e manuseio de peixes ocasiona estresse nos indivíduos e interfere diretamente em suas atividades naturais, sendo necessário sua anestesia para diminuição da letalidade e lesões traumáticas advindas pelo transporte. Os anestésicos utilizados atualmente são majoritariamente sintéticos e com custo elevado de obtenção, mas existem compostos naturais e com custos menores que apresentam a mesma função, como o óleo essencial de *Lippia alba* (OELA). Porém, os óleos são substâncias hidrofóbicas e necessitam da utilização de dispersantes para maior diluição do produto e maior aproveitamento. Ademais, o presente trabalho teve como objetivo verificar as respostas de estresse causadas pela anestesia utilizando o óleo essencial de *Lippia alba* em lambaris (*Astyanax lacustris*) em nível molecular e celular, com utilização de etanol como dispersante e tween. Após a anestesia e recuperação dos indivíduos, a partir da coleta de sangue foi realizada a dosagem de glicose e lactato e posteriormente a dosagem de cortisol. Para a análise da expressão gênica da enzima HSP 70 utilizou-se o fígado para obtenção de DNA complementar e posterior análise de PCR em tempo real. Os animais anestesiados com OELA na concentração de 250 ul/L com dispersante tween e etanol por um período de 10 minutos, 90,75% se encontraram anestesiados profundamente (estágio III). O dispersante tween e etanol apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados apenas no estágio II de anestesia em 10 minutos. A glicose apresentou aumento logo após a anestesia utilizando OELA na concentração de 250 ul/L com dispersante tween e etanol, mas apresenta diminuição posterior na exposição de 10 minutos. O lactato teve uma diminuição em relação ao grupo controle nas duas situações. O cortisol teve um aumento nos grupos anestesiados em relação ao grupo controle. A expressão gênica da enzima HSP 70 não apresentou diferença significativa entre os grupos controle, tween com OELA e etanol com OELA. A anestesia dos animais por um período de 15 minutos apresentou alta taxa de letalidade dos organismos (66,66%) e alta glicose sanguínea. Portanto, nota-se que o OELA é um anestésico eficiente e seguro para *Astyanax lacustris* no tempo de anestesia de 10 minutos, não acarretando estresse, e podendo ser utilizado para manejo e transporte de indivíduos por menor custo e com segurança para os animais.

**PALAVRAS CHAVES:** Lippia Alba - Anestésico – Estresse – Óleo Essencial – HSP70 – expressão gênica.

## ABSTRACT

REGINATO, LUCIANO AMADEU. M. CF, University of Vila Velha – ES, September de 2022. **Stress responses in lambari (*Astyanax lacustris*) anesthetized with lemon balm essential oil (*lippia alba*)**. Advisor: Dr. Levy de Carvalho Gomes.

The transport and arrivals of fish directly interfere with their natural activities, requiring their anesthesia to increase the lethality and traumatic ad transport. The Compounds All the compounds are essentially synthetic and cost-heavy high-cost, but they exist on the same basis as the smaller OELA work. However, hydrophobic substances are important in the use of dispersants for greater product dilution and greater use. In addition, the work aimed to control the cellular stress responses presented by anesthesia using the essential oil of Lip alba in lambaris (*Asstyanax lacustris*) at the molecular level and tween, using ethanol as a dispersant and tween. After anesthesia and capacity tests, from the blood collection, glucose and lactate analysis was performed and later the cortisol measurement. For the analysis of the gene expression of the HSP 70 enzyme, the power to complement the DNA and subsequent real-time PCR analysis was used. The animals anesthetized with OELA at a concentration of 250  $\mu$ L/L with tween dispersant and ethanol for a period of 10 minutes, 90.75% were deeply anesthetized (stage III). The tween and ethanol significantly differed ( $p < 0.05$ ) when compared only in stage II anesthesia in 10 minutes. Glucose presented shortly after anesthesia using OELA at a concentration of 250  $\mu$ L/L with dispersant between and ethanol, but shows further increase at 10 min exposure. Lactate had an increase in relation to the control group in both situations. Cortisol was increased in the anesthetized groups compared to the control group. The gene expression of the HSP 70 enzyme showed no significant difference between the control, tween with OELA and ethanol with OELA groups. Anesthesia of the animals for a period of 15 minutes showed a high lethality rate of the organisms (66.66%) and high blood glucose. Therefore, OELA is a little bit more efficient for *Astyanax* in 10 minutes stress time and can be used to manage and transport to smaller animals cost and safely.

KEYWORDS: *Lippia Alba* - Anesthetic - Stress - Essential Oil - HSP70 - gene expression.

# INTRODUÇÃO

## 1.1 ANESTÉSICOS EM PEIXES

O manuseio e o transporte de peixes é uma situação estressante e que demanda energia, obtida através de glicogenólise, glicogênese e aumento na produção de proteínas (MOMMSEN *et al.*, 1999; PANKHURT, 2011). Qualquer estímulo ou manejo que cause estresse pode gerar uma ou mais mudanças fisiológicas e/ou de comportamentos, que podem ocasionar diminuição da alimentação, mudança na natação, sensibilidade, e conseqüentemente atrasar o crescimento e a mortalidade (BARTON, 1997).

A utilização de anestésicos, advindos de forma sintética ou natural, em concentrações sedativas durante o manuseio de peixe tem sido um instrumento essencial para diminuir os estímulos, sensibilidade, tempo de natação e estresse dos peixes (ROSS E ROSS, 2008; ZAHL *et al.*, 2010, ASADI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015; ZEPPEFELD *et al.*, 2016). Seu uso como sedativo para manuseio iniciou-se a partir de observações dos índios americanos que depositavam *Rodenona (Derris elliptica)* para sedar e capturar os peixes na natureza (GIMBO, 2008).

Atualmente, sabe-se que os anestésicos são eficientes na redução ou diminuição do estresse aos peixes, na redução de estímulos visuais, no consumo de oxigênio e na mobilidade dos peixes, evitando assim lesões traumáticas durante o manuseio do animal e transporte, diminuindo a taxa de mortalidade. (CUNHA *et al.*, 2010). Mesmo a anestesia parecer diminuir o impacto de agentes estressores, é importante a determinação de concentrações seguras dos

fármacos com propriedades anestésicas para se evitar efeitos adversos na prática, pois a uso de quantidade excessiva de anestésico pode promover alterações metabólicas e até a morte dos animais (PARK *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2017).

Os anestésicos mais usados nas pisciculturas são o MS 222 (tricaína metanosulfonato), 2-fenoxietanol e a quinaldina, que possuem custo elevado, o que dificulta a aquisição pelos pequenos criadores, evidenciando a necessidade da obtenção de anestésicos de origem natural que apresentam baixo custo de obtenção. Dentre os produtos naturais que vem sendo estudados, tem-se os óleos essenciais, como de *Lippia alba*, *Ocimum gratissimum* e *Aloysia triphylla*, que apresentam propriedades anestésicas em organismos aquáticos e vem apresentando resultados satisfatórios (AZAMBUJA *et al.*, 2011; BENOVIĆ *et al.*, 2012; PARODI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

As respostas metabólicas e antioxidantes dos peixes submetidos a anestésicos ainda é pouco investigada (TONI *et al.*, 2015; PARODI *et al.*, 2012), necessitando de mais pesquisas na área. Embora as substâncias anestésicas vem sendo utilizadas para minimizar estes efeitos estressantes. (CUNHA *et al.* 2010).

## **1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANESTÉSICOS PARA PEIXES**

O uso de óleos essenciais extraídos de plantas, como *Lippia alba* e *Syzygium aromaticum*, utilizados como anestésico para peixes parece ser uma opção viável frente ao alto custo e dificuldades em aquisição dos produtos químicos disponíveis no mercado para esta finalidade. (CUNHA *et al.* 2010;

AWAAD, 2017). O óleo de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), o qual possui como principal constituinte o eugenol, foi reconhecido como anestésico efetivo para sedar peixes (SOTO & BURHANUDDIM, 1995).

O Eugenol é um depressor do sistema nervoso central, utilizado principalmente em odontologia e medicina como antisséptico, analgésico e anestésico (DAVIDSON *et al.*, 2000), possui ação efetiva em baixas concentrações, reduzindo o estresse, segundo estudo em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), constituindo baixo custo, fácil aquisição e é uma mistura de substâncias orgânicas segura para o meio ambiente (IVERSEN *et al.*, 2013).

O gênero *Lippia* inclui aproximadamente 200 espécies de pequenos arbustos. A *Lippia Alba* (erva cidreira) é uma planta medicinal nativa e muito usada na América Central, na África do sul e no Sul dos Estados Unidos Da América. O óleo essencial das folhas desta planta é um anestésico e vem se mostrando uma alternativa viável como anestésico em peixes (SOARES & TAVARES – DIAS 2013; TERBLANCHE & KORNELIUS, 1996; HENNEBELLE *et al.*, 2008).

Dentre os óleos essenciais, a *Lippia Alba* (erva cidreira) tem sido a espécie mais estudada do gênero, do ponto de vista farmacológico e o Óleos essenciais de *Lippia alba* (EOLA) tem benefício à saúde como: atividade anti-inflamatória, ansiolítica e propriedades bioativas. A *Lippia Alba* é fácil de ser cultivada, possui um grande potencial agrônomo, com um desenvolvimento rápido, propagação clonal e rusticidade, sendo promissora para as indústrias químicas e farmacêuticas (YAMAMOTO *et al.* 2008; SACCOL *et al.*, 2013). As atividades sedativas e miorelaxante de *Lippia Alba* já são utilizadas pela

medicina popular e já foram evidenciadas em roedores (ZÉTOLA *et al.*, 2002).

A atividade neurossedativa de LA já estudada em diversos espécie aquática. Em jundiá (*Rhamdia quelen*) observou a eficácia anestésica com diminuição dos níveis de cortisol plasmático sem alterar o odor e sabor dos filés, sendo usada nas concentrações de 5 a 500 µL L em tempo máximo de observação igual a 30 minutos (CUNHA *et al.*, 2010).

Os anestésicos são agentes químicos ou físicos, que com o aumento da exposição ou da concentração, sedam um animal e depois causam perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e das reações reflexas, por evitarem o início e condução do impulso nervoso (SUMMERFELT & SMITH, 1990). Em peixes, os estágios de anestesia se dividem em cinco estágios (Tabela 1), sendo o último a morte do animal, notáveis em comportamento.

**Tabela 1.** Estágios de anestesia em peixes\*

Estágios	Descrição	Comportamento
0	Normal	Reativos a estímulos externos; batimentos operculares normais; reação muscular normal.
1	Sedação leve	Natação agitada, aumento movimento opercular, reativo a estímulos externos.
2	Sedação profunda	Perda parcial equilíbrio e tônus muscular, queda do movimento opercular.
3	Anestesia profunda	Perda total equilíbrio e tônus muscular, batimento opercular lento.
4	Colapso medular	Parada da ventilação e morte eventual.

\*Modificada de Ross & Ross 2008.

### 1.3 ESTRESSE EM PEIXES EXPOSTOS AOS ANESTÉSICOS

Os peixes expressam um conjunto de respostas fisiológicas frente ao fator de estresse, que consistem no reconhecimento do estressor pelo sistema nervoso central, na qual são notadas as reações hormonais do eixo Hipotálamo-hipófise-

interrenais (HHI), e com liberação das catecolaminas e do cortisol (BARTON & IWANA, 1991). O aumento de catecolaminas e de cortisol plasmático resulta em aumento da atividade cardíaca e respiratória, alterando a circulação e a capacidade de trocas gasosas nas brânquias. Além disso, causam alterações no desbalanço de sódio (Na<sup>+</sup>), cloro (Cl<sup>-</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e amônia plasmáticos (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Para se proteger contra o estresse oxidativo, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes, que incluem enzimas como superóxido dismutase e catalase (SABERGO *et al.*, 2015) que auxiliam na detecção de estresse. Ademais, a glicose plasmática tem um importante papel no metabolismo de peixes, sendo outro importante indicador juntamente com Cortisol, para diagnosticar a ocorrência de estresse fisiológico (WEDEMEYER *et al.*, 1990).

Em um estudo realizado utilizando *Lippia Alba* como anestésico em tilápias, não se detectou nenhuma morte após quatro horas de transporte dos peixes, além de notar-se que os níveis de glicogênio e lactato no fígado e músculo foram significativamente menores em todos os grupos transportados com a *Lippia Alba* em comparação com grupo controle (sem anestésico) (SALBEGO *et al.*, 2017). Em comparação, um estudo utilizando benzocaína na água dos tanques de transporte de Matrinxã (*Brycon amazonicus*), notou-se o aumento dos níveis de cortisol plasmático, concluindo que não houve diminuição da resposta fisiológica ao estresse do transporte (HOSHIBA *et al.* 2009).

É válido ressaltar também que variações mínimas na dose de benzocaína podem provocar alterações significativas na glicose sanguínea e glicogênio hepático, sugerindo cuidado a utilização do mesmo para prevenir a morte ou

injúria física pelo uso de concentração inadequadas (CARNEIRO *et al.*, 2002).

#### **1.4 DISPERSANTES PARA ÓLEOS ESSENCIAIS**

Os efeitos anestésicos e sedativos do EO de *Lippia alba* foram comprovados em indução anestésica de várias espécies de peixe (CARNEIRO *et al.*, 2002; BENOVIĆ *et al.*, 2012; HOHLENWERGER *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2019). Entretanto, os EO são imiscíveis em água, sendo necessário um tensoativo para tornar o produto efetivo. Essas substâncias apresentam em sua estrutura molecular uma região apolar e outra polar e, que levam à formação de emulsões água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A). Portanto, reduzem a tensão interfacial entre os líquidos, diminuindo, assim, a energia necessária para dispersar um líquido do outro, dividindo uma das fases do sistema heterogêneo em pequenos glóbulos, o que resulta em um aumento considerável da superfície de contato e mistura de fases (ELFIYANI *et al.*, 2017).

O etanol é o produto mais utilizado para esse fim, geralmente na proporção de 1:10. Com a utilização do etanol é perceptível a formação de um sistema heterogêneo, em que o EO fica na superfície do tanque enquanto o solvente se dilui na água, o que dificulta a disponibilidade de compostos e, conseqüentemente, a sua absorção pelos animais (POSTAY *et al.* 2019). Um estudo realizado por POSTAY (2019), demonstrou que a formação de emulsão de óleo de *Lippia alba* em Polisorbato 20 (Tween20) antecipa a indução anestésica comparado com a solução de etanol. Obtendo assim uma indução mais rápida de anestesia, concluindo que houve aumento da miscibilidade do óleo na água no processo de anestesia por imersão.

## 1.5 *ASTYANAX LACUSTRIS* (LAMBARI)

O lambari (*Astyanax lacustris*) é uma espécie de peixe de pequeno porte que atinge cerca de 10 a 15 cm de comprimento, chegando a atingir 60 gramas de peso, possui hábito alimentar onívoro, seu crescimento é rápido (RODRIGUES *et al.*, 2013) e é encontrado exclusivamente na América do Sul (DIAS *et al.*, 2018). Podem existir cerca de 100 espécies deste gênero, que ocorrem na América Central e do sul, sendo largamente presentes nas bacias hidrográficas brasileiras (BALDISSEROTTO & GOMES, 2013). A espécie é conhecida por sua facilidade reprodutiva, por se reproduzir várias vezes ao ano. (ORSI, 2010)

Não existem dados oficiais sobre a produção desta espécie em cativeiro, mesmo sendo uma espécie promissora para a piscicultura brasileira e tão pouco existem pesquisas com *Astyanax lacustris* (RODRIGUES *et al.*, 2013). Segundo Gonçalves *et al.*, 2012 a espécie tem grande potencial econômico e também pode ser utilizada como isca para pesca esportiva, é bem aceita como petiscos e por estas razões o cultivo pela aquicultura está aumentando.



**Figura 1.** Foto de *astyanax lacustris* sob balança analítica.

## 1.6 HIPÓTESE

H1: *Lippia alba* como anestésico não causa estresse no lambari (*Astyanax lacustris*) submetidos a anestesia por esta substância.

H0: *Lippia alba* como anestésico causa estresse em lambari (*Astyanax lacustris*) submetidos a anestesia por esta substância.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as respostas de estresse bioquímico e expressão gênica causada pelo manuseio de lambari (*Astyanax lacustris*) após a exposição à *Lippia Alba* como anestésico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar níveis de cortisol sérico dos peixes submetidos a anestesia com *Lippia Alba* em comparação com não submetidos a anestesia;
- Mensurar níveis plasmáticos de glicose e lactato;
- Verificar se o uso do anestésico bloqueia a resposta do estresse no manuseio do animal;
- Verificar qual solvente é mais efetivo álcool x T20, como dissolvente no anestésico.
- Observar a expressão genica da enzima HSP 70 no fígado do animal;
- Observar se o tempo de exposição ao anestésico pode influenciar na resposta do estresse.

### 3. METÓDOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos foram em conformidade com o estabelecido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha (CEUA – UVV).

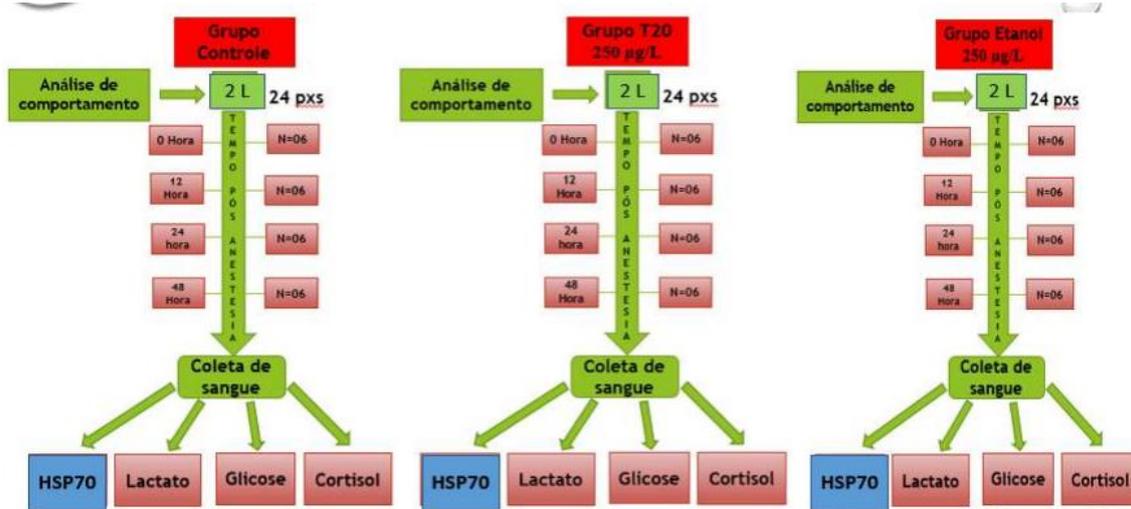
Foram utilizados juvenis de lambari (*Astyanax lacustris*) com aproximadamente 3 meses de idade, 7.77 gr com DP de  $\pm 2.47$  e tamanho de 7.64 cm com DP de 0.90, procedentes de um produtor privado da região de Itaguaçu - ES. Os peixes foram transportados para o laboratório na Universidade Vila Velha e condicionados por 90 dias em um tanque de 500 L com aeração constante e sistema de filtragem com recirculação de água. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração comercial contendo 28% de proteína. Durante o período de aclimação, a qualidade da água foi monitorada a cada 5 dias por meio do pH, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e dureza. Todas as coletas de material foram realizadas na parte da tarde visto que os peixes, quando submetidos a um ciclo diário de luz/escuro evidenciam um padrão de atividade locomotora que os podem classificar como diurnos, noturnos e crepusculares (HERRERO *et al.*, 2003; SCHULZ e LEUCHTENBERGER, 2006; BLANCO-VIVES e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009). Portanto o ciclo luz/escuro tem sido considerado um importante fator ambiental sincronizadores do ritmo biológico, sendo um fator importante para sincronização do ritmo de atividade em peixes (VERA *et al.*, 2007). Portanto o efeito do ciclo circadiano foi levado em consideração para a análise dos dados bioquímicos.

### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em 2 etapas, sendo a primeira com 72 peixes distribuídos aleatoriamente em 3 grupos e avaliados nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas após a anestesia por *Lippia alba*, e a segunda realizada também com 72 peixes distribuídos em 3 grupos e submetidos à 3 tempos de indução (10, 15 e 20 min) do anestésico. Ambos seguiram um delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas.

Na primeira etapa 72 peixes foram divididos em três tratamentos (n=24 cada) (Figura 2): 1) controle sem anestésico; 2) *Lippia alba* (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10); 3) *Lippia alba* (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20). A concentração foi escolhida com base no estudo de Cunha *et al.* (2010) com *Rhamdia quelen*

Após o período de aclimatação, os animais foram submetidos individualmente a 10 minutos de indução anestésica em aquários de 6 L, contendo 2 L de água. O tempo para atingir os diferentes estágios comportamentais de anestesia foi avaliado de acordo com Ross e Ross (1999) – (Tabela 1). Após a anestesia, os peixes foram colocados individualmente em outros aquários de 20 L isento de OELP com aeração constante para monitorar o tempo de recuperação. Os animais foram considerados recuperados quando demonstraram natação normal e reação a estímulos externos (Tabela 1). Após a recuperação, os peixes foram reavaliados nos seguintes momentos (n=6 para cada momento): 0, 12, 24 e 48 h após a anestesia. Conforme mostra a figura abaixo.

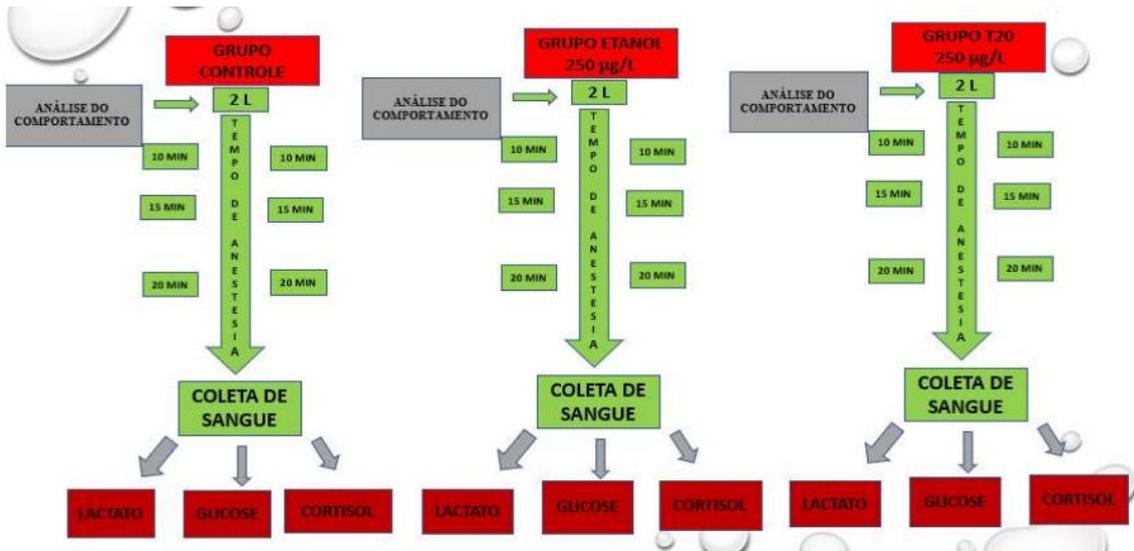


**Figura 2.** Desenho do experimento I.

O segundo experimento (Figura 3) continham 03 grupos colocados em cenários diferentes e com tempo de indução anestésico distintos (10, 15 e 20 min) com o intuito de analisar se o tempo de indução do OE da *Lippia alba* é um fator estressante ao animal. Foram utilizados um grupo controle, um grupo com OE disperso no etanol e um terceiro grupo de peixes a indução anestésica no do OE disperso no polissorbato 20 na concentração 1:1000. Foram anestesiados 6 peixes para cada combinação de tempo e tratamento.

Cada animal foi utilizado apenas uma vez. Foram anestesiados em aquários individuais de 6L contendo 2L de água. O tempo de exposição foi de 10, 15 e 20 minutos. (temperatura -  $23,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ). Após a exposição, os peixes foram transferidos para um aquário de recuperação de 30L contendo 20 L de água, com ausência de EO e aeração constante. Os animais foram considerados recuperados quando demonstraram natação normal e reação a estímulos externos (Tabela 1).

Após cada etapa dos testes foram coletados sangue da veia caudal, com seringa heparinizada.



**Figura 3.** Desenho do experimento II.

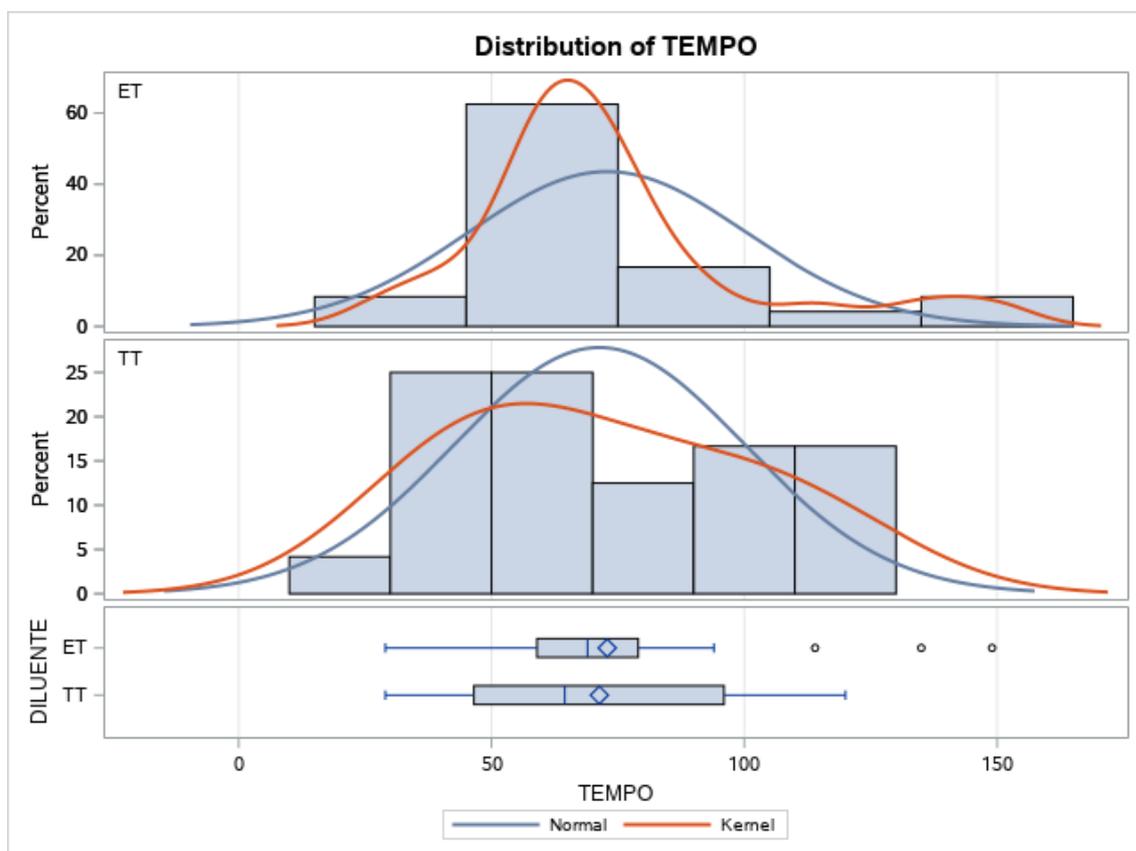
Com as amostras de sangue foram realizadas as análises de glicose com aparelho portátil da marca On-Call® Plus – Acon Laboratório, INC –Califórnia - USA, e lactato em um aparelho portátil Modelo TD-4261 – Eco Diagnóstica LTDA - Corinto – MG – Brasil, e uma alíquota de sangue foi centrifugado (3000G -10 minutos) e estocado em freezer -80 °C para análise da concentração de cortisol plasmático por meio do teste de ELISA. O fígado do animal foi acondicionado em frascos Eppendorf com RNA later para análise molecular do gene relacionado a enzima HSP 70.

Para análise de estatísticas os dados obtidos foram avaliados em relação a normalidade e homogeneidade de variâncias e apresentados como média e desvio padrão para dados paramétricos. Posteriormente foi aplicada uma Análise de Variância de dois fatores (tratamento, tempo e tratamento\*tempo), seguida do teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) no programa SAS. Para análise do segundo experimento foi utilizado o teste t.

## 4 ANÁLISES E RESULTADOS.

### 4.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL EXPERIMENTO I

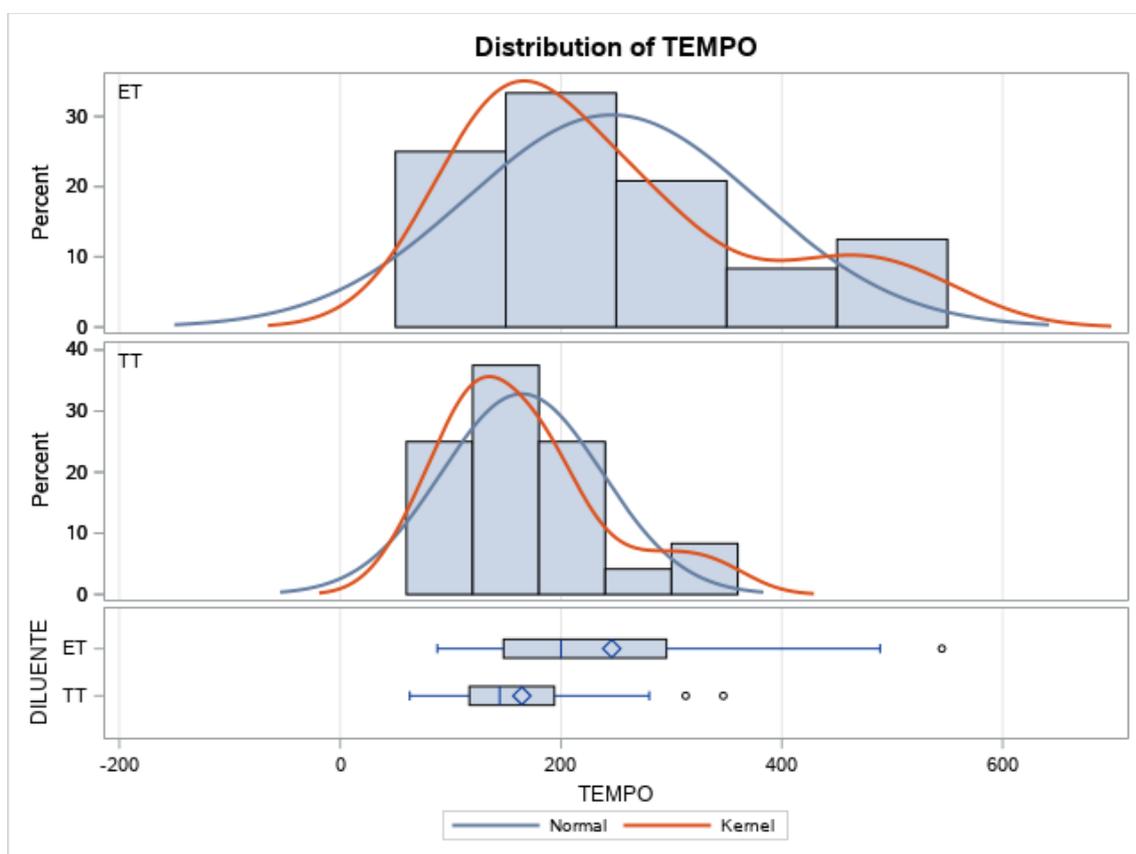
Em relação ao estágio I de anestesia (tabela 1, sedação leve), observa-se que não houve diferença estatística entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) (Figura 4). Portanto para atingir a sedação leve (estágio I) não existe diferença estatística entre os dispersantes Etanol e T20 na espécie *Astyanax lacustris*.



**Figura 4.** Avaliação do estágio I de anestesia por tratamento (T20 x Etanol). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e posteriormente o teste t para

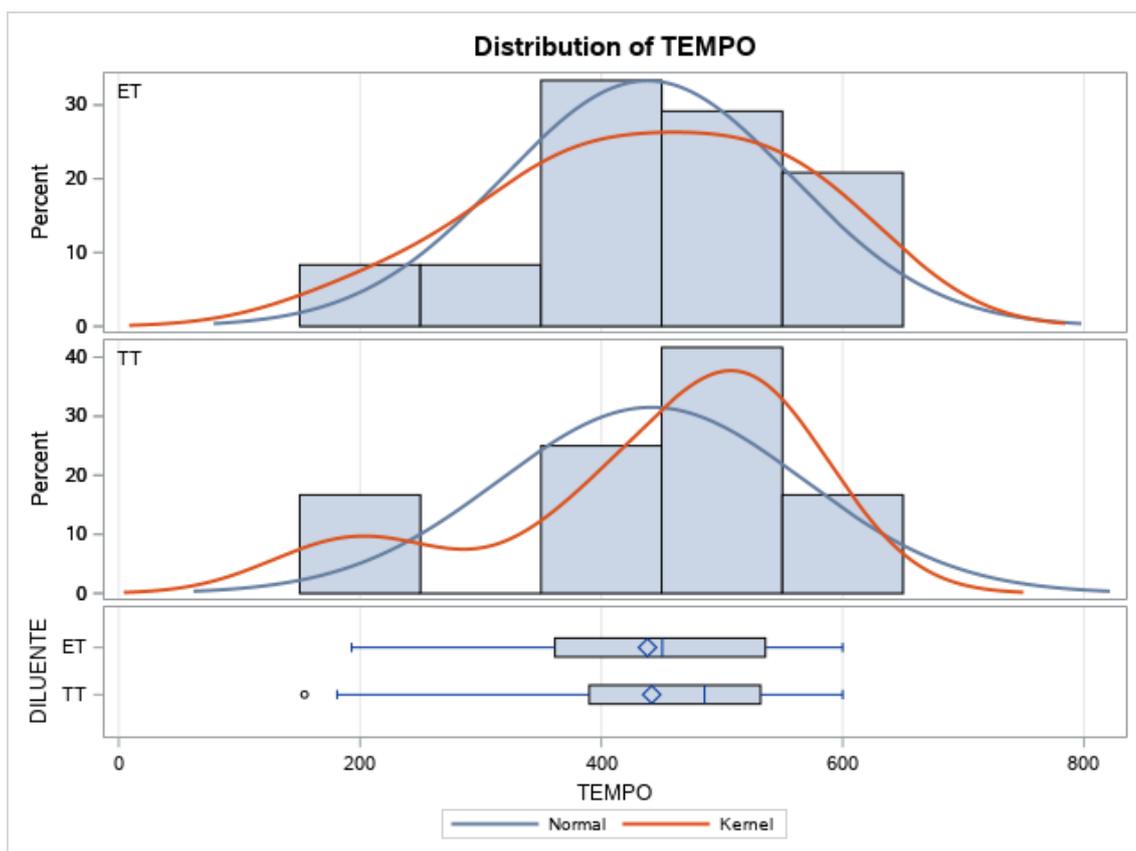
comparação dos tipos de tratamentos com 95% de confiabilidade. ET = Etanol; TT = Tween 20.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 5) observou-se uma diferença estatística entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20). Estatisticamente para atingir o estágio II de anestesia o Tween20 mostrou-se mais eficaz na espécie *Astyanax lacustris*.



**Figura 5.** Avaliação dos estágios II de anestesia por tratamento (T20 x Etanol). A análise estatística foi realizada utilizando AVONA e posteriormente o teste T para comparação dos tipos de tratamentos com 95% de confiabilidade. ET = Etanol; TT = Tween 20.

Não houve diferença estatística entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) (Figura 6). Portanto para atingir o estágio III não existe uma diferença estatística entre o diluentes ET ou TT.

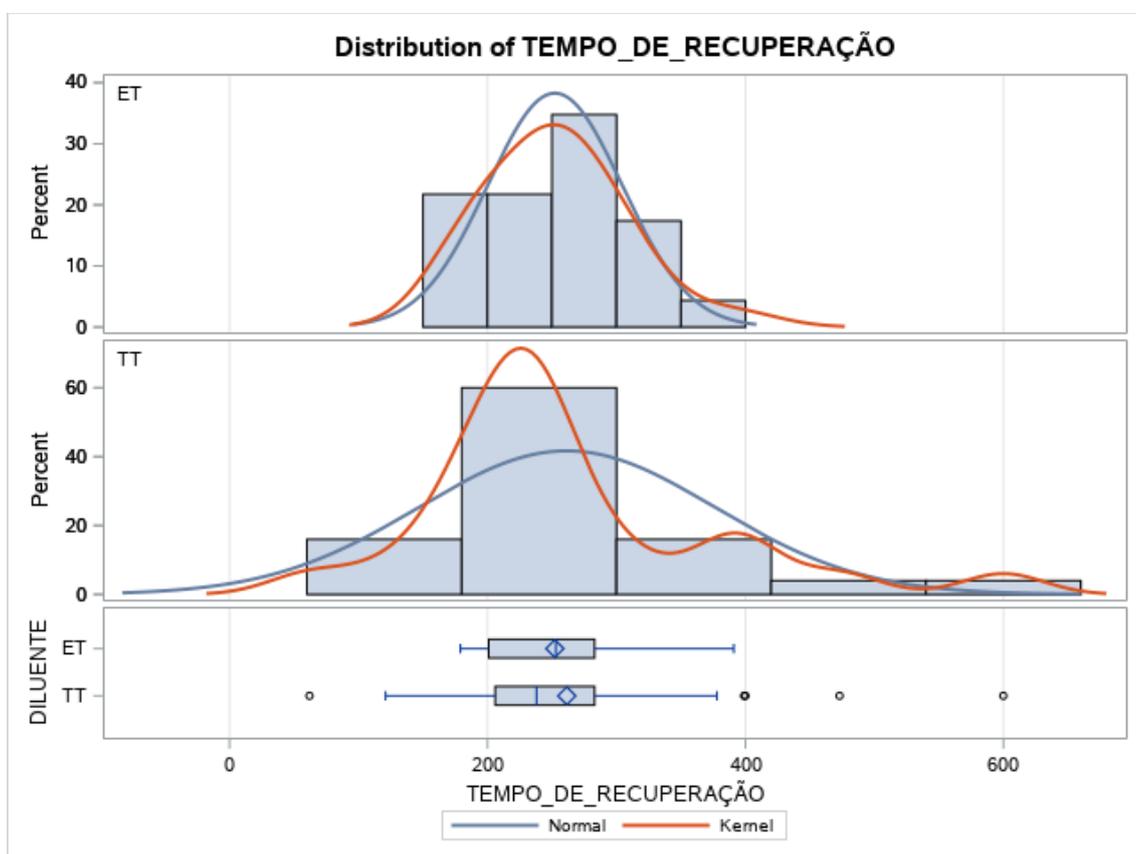


**Figura 6.** Avaliação do estágio III de anestesia por tratamento (T20 x Etanol). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA.e posteriormente o teste T para comparação dos tipos de tratamentos com 95% de confiabilidade. Etanol; Tween20.

Portanto em relação ao dispersante Tween x Álcool, podemos dizer que existe uma diferença estatística apenas para atingir o estágio II, demais estágio não houve diferença estatística. Com o estudo pode-se observar o comportamento do animal, com a dose de 250 µg/L exposto a 10 minutos em

imersão na solução anestésica, apenas 5 animais não atingiram o estágio III de anestesia profunda, o que significa 9,25% da amostra e a grande maioria atingiu o estágio III. Não houve morte de nenhum animal com esta dose neste tempo de exposição, o que conclui que este tempo de exposição e a dosagem de 250 µg/L é segura para esta espécie de peixe. Nenhum animal atingiu o estágio IV (morte, Tabela I)

Em relação ao tempo de recuperação também não houve diferença estatística, conforme podemos ver na figura 07.



**Figura 7.** Avaliação da recuperação pós anestesia por tratamento (T20 x Etanol). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA e posteriormente o teste T para comparação dos tipos de tratamentos com 95% de confiabilidade. ET =nEtanol; TT = Tween20.

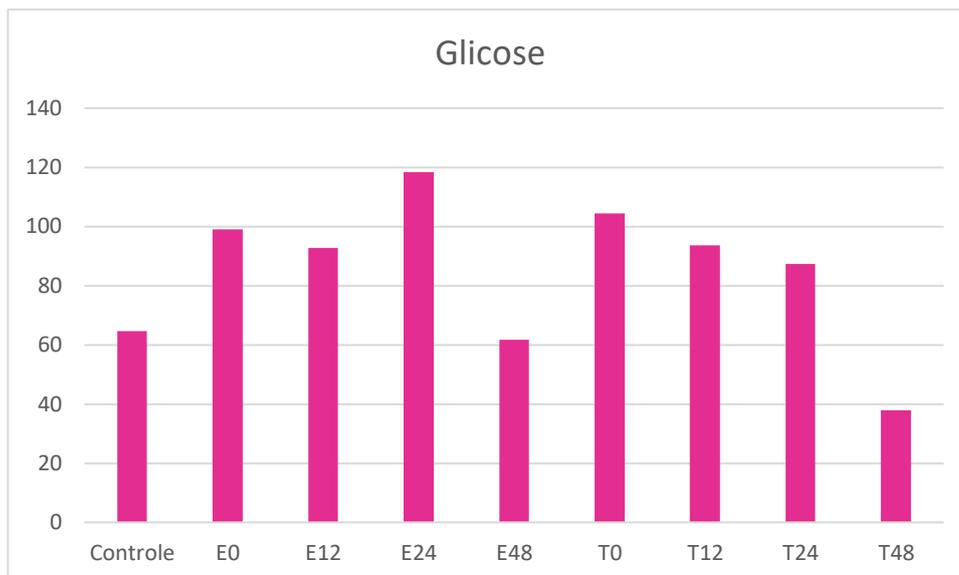
**Tabela 2.** ANOVA comparativo por tipos de tratamentos. Dados expressos em média e desvio padrão. NS = não significativo; \* = não significativo.

	Etanol	T20
Estagio 1	72.88± 27.49a	71.33± 28.69a
Estagio 2	245.96 ± 132.05a	164.50 ± 72.94b
estagio 3	405.90±103.83a	435.26 ±124.62a
Recup	251.13±52.15a	264.30 ±119.52a

## 4.2 ANÁLISE BIOQUÍMICAS DO EXPERIMENTO I

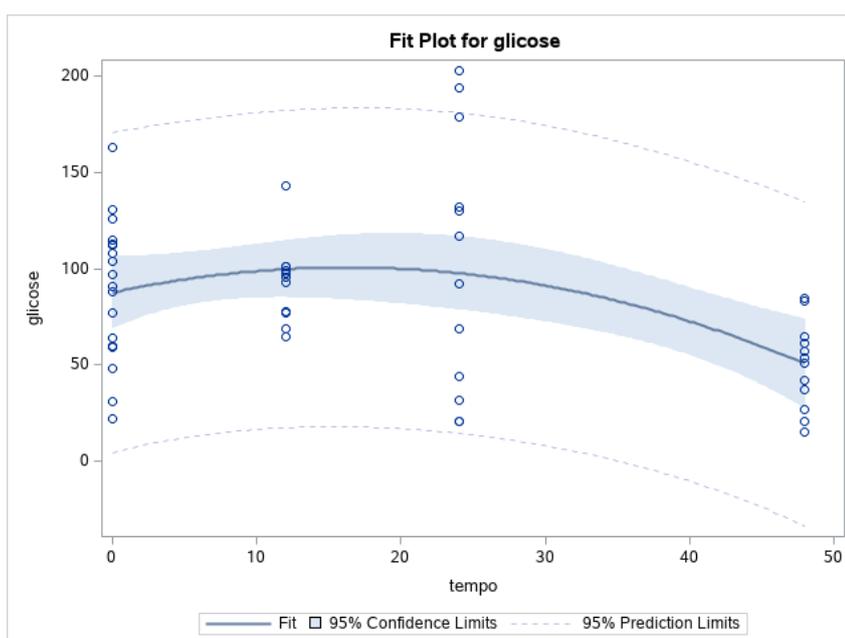
Vários autores tem investigado a resposta ao estresse em peixes e todos avaliam os níveis de cortisol e seu aumento com um indicador de resposta ao estresse (SAMALL, 2003; KOAKOSKI *et al.*, 2012). No estresse a liberação de cortisol tem como consequência as alterações bioquímicas no sangue e nos tecidos dos peixes, incluindo também um desequilíbrio eletrólito, hiperglicêmico, depressão de reservas de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (BARTON, 2002; WEBER, 2011).

Em relação a análise dos valores da Glicose, observamos os seguintes resultados:



**Figura 8.** Valor médio da Glicose em cada tratamento. E= Etanol; T = Tween20;

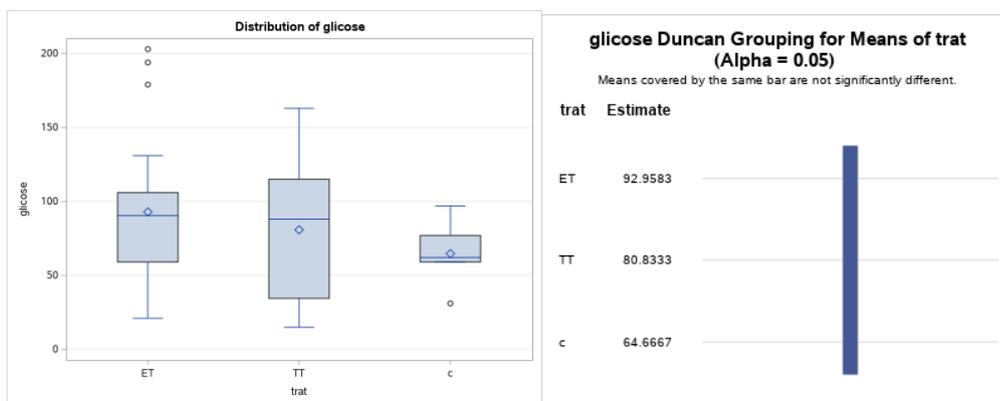
De acordo com a figura 8, nota-se que quanto maior tempo após a exposição, principalmente com diluente T20, menor a taxa de concentração de glicose em relação ao grupo controle. A exposição ao anestésico seja ele com diluente Etanol, ou seja, com diluente T20 existe um aumento importante na concentração de glicose logo após a anestesia, mas com passar do tempo tende a diminuir.



**Figura 9.** Apresentação do comportamento da glicose no modelo quadrático em

relação ao tempo após a exposição ao anestésico OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) .Com 95% de confiabilidade no limite dos dados.

Na dispersão da Glicose utilizou-se o modelo quadrático que é o que mais se adequou ao comportamento da glicose com uma confiabilidade de 95%. Observamos que o comportamento da glicose no animal tende a aumentar nas primeiras horas após o animal ser submetido a anestesia com OE de LA, mas que a tendência é diminuir ao passar do tempo. Mostrando que o OELA pode ser utilizado como anestésico sem causar estresse ao animal e que em um curto espaço de tempo após o estresse ao animal a glicose tende a diminuir.



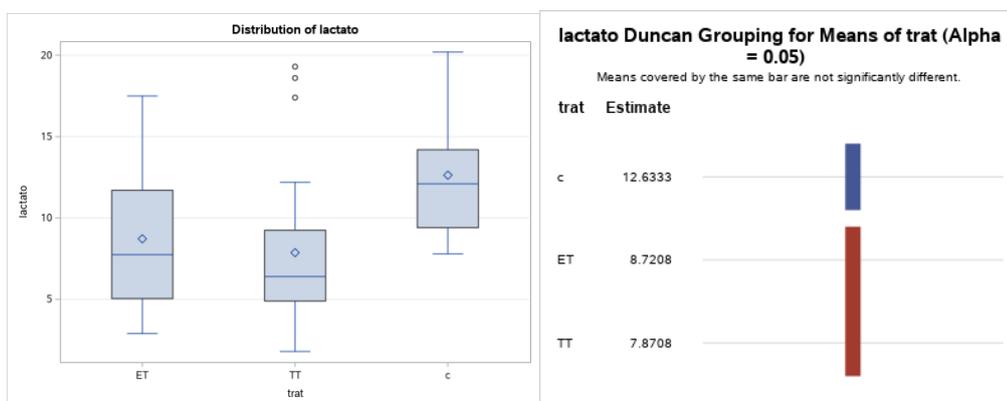
**Figura 10.** Apresentação dos dados do valor da glicose por tipo de tratamento e grupo controle suas médias de acordo com teste Duncan com Alpha de 0,05. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). ET = Etanol; TT = Tween20; C = Controle.

De acordo com a figura 10, observa-se que não existe uma diferença

estatística das médias entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) e no grupo controle. Mas observamos uma amplitude menor dos dados no grupo controle, ou seja, o valor da glicose tende a ter uma oscilada quando submetida aos anestésicos em relação ao grupo controle.

O lactato também é um importante indicador para o estresse e indica o acúmulo de ácido lacto decorrente do aumento físico à medida que os animais são expostos a situações estressantes. (BARTON, 2002). O presente estudo também avaliou a resposta do estresse mensurando o Lactato.

Em relação ao Lactato averiguamos os seguintes dados:

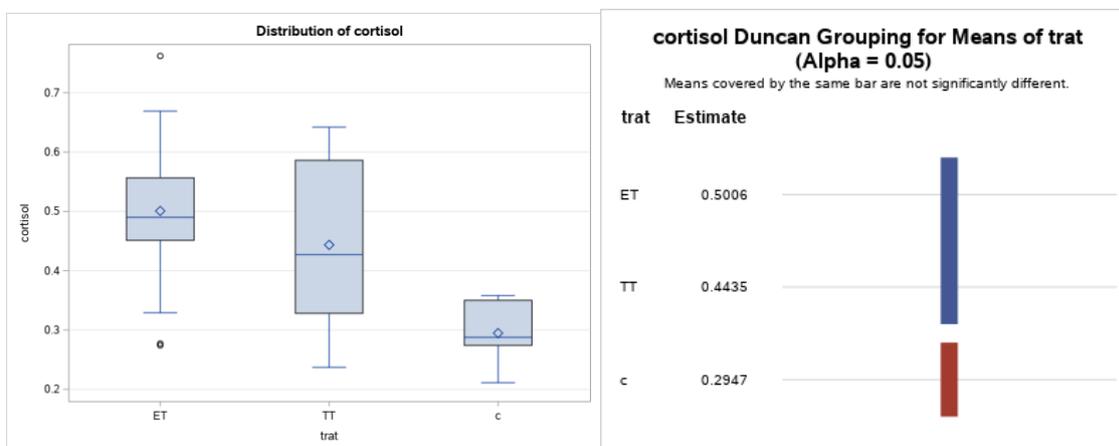


**Figura 11.** Apresentação dos dados do valor da lactato por tipo de tratamento e grupo controle suas médias de acordo com teste Duncan com Alpha de 0,05. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). ET = Etanol; TT = Tween20; C = Controle.

De acordo com a figura 11 nota-se que houve uma diferença estatística

das médias entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) e no grupo controle. Observamos uma média maior no grupo controle, em relação aos outros dois tratamentos submetidos aos anestésicos. Com isso podemos dizer que os anestésicos nesta concentração, com estes dispersantes, nesta espécie de peixe podem diminuir o lactato no manuseio do animal, um forte indício que os anestésicos são eficazes para diminuir o estresse e liberação do lactado do animal submetido ao estresse pela manipulação.

O cortisol que é um dos principais corticosteroides em peixes, e é considerado um bom indicador para avaliação primária do estresse (BARTON, 2002). A elevação do cortisol no plasma, além de modificar modular os metabolismos dos carboidratos, interfere no metabolismo proteico (MOMMSEN et.al 1999).



**Figura 12.** Apresentação dos dados do valor do cortisol por tipo de tratamento e grupo controle suas médias de acordo com teste Duncan com Alpha de 0,05. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). ET = Etanol; TT = Tween 20; C =

Controle.

De acordo com a figura 12 observamos que existe uma diferença estatística das médias entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250 µg/L de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250 µg/L) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) e no grupo controle. Observamos uma média menor no grupo controle em relação aos outros dois tratamentos.

Em um estudo dos níveis de cortisol plasmático de bagre de prateado (*Rhamdia quelen*) que foram anestesiados com o óleo essencial de *L. alba* foram significativamente inferiores aos do grupo controle (Cunha, *et al* 2017). Este achado é diferente do estudo realizado com a espécie de *A. Lacustris* onde o índice de cortisol é menor no grupo controle do que nos anestesiados com OE de LP.

Além da elevação do cortisol, normalmente no estresse provoca um aumento nos níveis de glicose e lactato plasmático (PANKHUST, 2011).

Neste estudo não houve aumento e diferença das médias para glicose, houve uma diminuição nos níveis de lactato para grupo submetido a anestesia com OELA em reação ao grupo controle e um aumento do cortisol nos grupos anestesiados em comparação ao grupo controle. O que nesta espécie de peixe difere da maioria encontrada na literatura em relação ao comportamento bioquímico do cortisol.

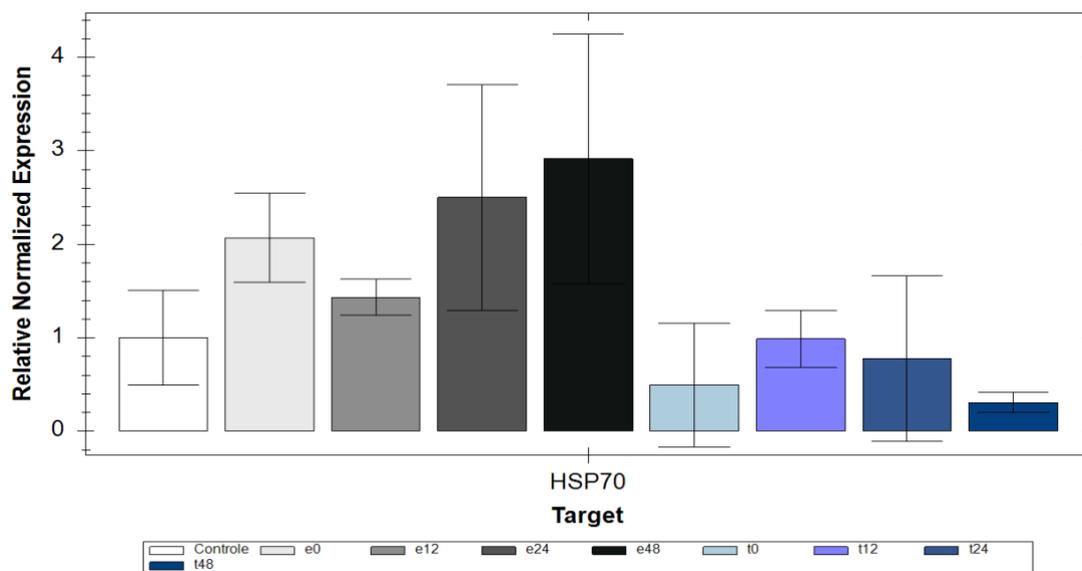
**Tabela 3.** ANOVA comparativo por tipos de tratamentos. Dados expressos em média e desvio padrão.

	Trat	Tempo	T*T		Etanol	T20	Controle
Glicose	NS	*	NS	Glucose	92.95 ±46.33a	80.83 ±44.66a	64.66 ±21.84a
Lactato	NS	*	NS	Lactato	8.72 ±4.25a	7.87 ±4.77a	4.36 ±0.29 <sup>a</sup>
Cortisol	*	*	NS	Cortisol	0.50 ± 0.12a	0,44 ±0.13a	0.29 ± 0.05b

## 4.3 ANÁLISES MOLECULARES E EXPRESSÃO GÊNICA

### EXPERIMENTO I

Com o presente estudo avaliou a expressão da enzima HSP 70, precursora dos estresses advindos do manejo de animais. A resposta secundária ao estresse também é caracterizada por alterações da síntese das proteínas de choque térmico (Heat shock proteins - Hsp). Estes ajustes fisiológicos visam à manutenção da homeostase através de alterações no metabolismo energético, equilíbrio ácido-básico e osmótico, entre outros (IWAMA et al., 1999; BARTON, 2002). Para avaliar a expressão relativa dos genes foi quantificada com o auxílio do software CFX Manager 3.1 (Bio-RAD, Hercules, CA, USA), pelo método  $\Delta\Delta Cq$  (Ghelichpour et. al.; 2019) e nesse caso foi realizada análise descritiva dos dados.



**Figura 13.** Apresentação dos dados do valor expressão génica da Enzima HSP70.

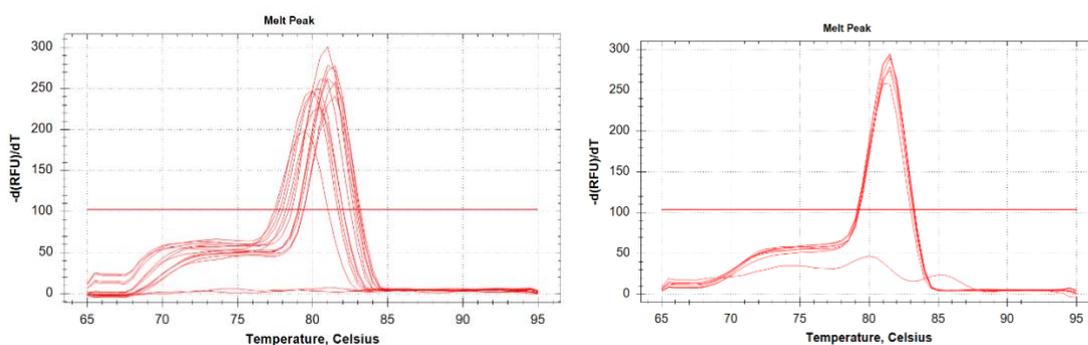
Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias Alpha ( $p \leq 0,05$ ). e0 = Etanol tempo zero após a exposição ao anestésico; e12 = Etanol tempo 12 horas após a exposição ao anestésico; e24 = Etanol tempo 24 horas após a exposição ao anestésico; e48 = etanol tempo 48 horas após a exposição ao anestésico; t0 = Tween tempo zero após a exposição ao anestésico; t12 = Tween tempo 12 horas após a exposição ao anestésico; t24 = Tween tempo 24 horas após a exposição ao anestésico.

De acordo com a figura acima observamos que não houve diferença estatística entre os animais submetidos a anestesia com OE de LA na concentração (250  $\mu\text{g/L}$  de água) disperso em etanol (1:10) ou o OE de LP na concentração de (250  $\mu\text{g/L}$ ) disperso em T20 (1:1000) (Tween® 20) e no grupo controle.

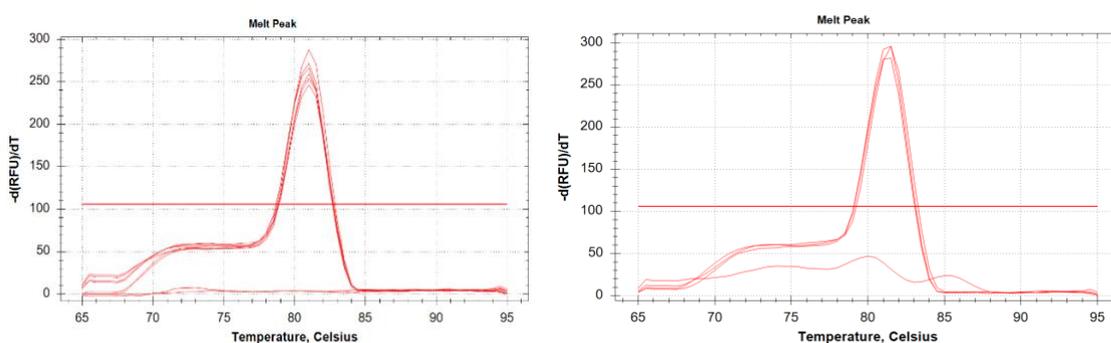
Não existem estudos para esta espécie de peixe para realizar a comparação. De acordo com a expressão génica deste estudo verificamos que

o OE de LA suspenso em Etanol ou T20 não aumenta a expressão gênica da Enzima HSP 70 quantificada no fígado da espécie *Astyanax lacustris*.

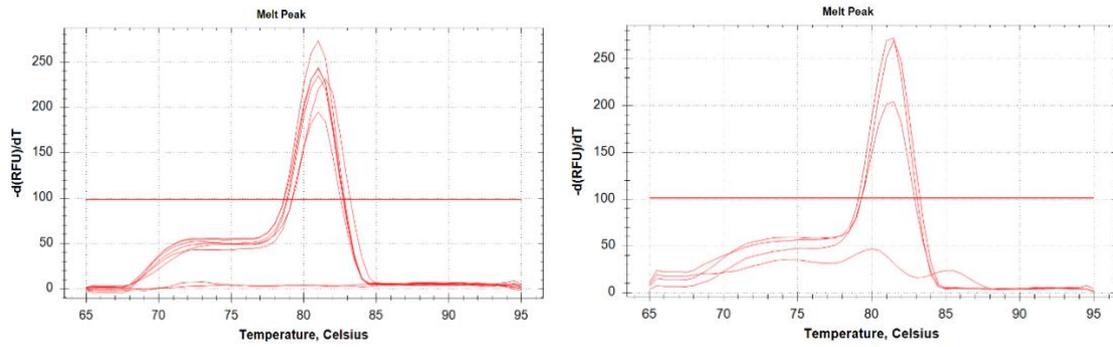
Abaixo segue figuras dos gráficos que mostram a amplificação do gene da enzima HSP 70 de cada tratamento e do grupo controle. Neles é possível observar o momento do início da ampliação do DNA do gene, bem como os números mínimos de ciclos para atingir a ampliação “theshold”. E ao lado a comparação com o gene de referência Ef1 para a espécie *Astyanax lacustris*, que é um gene já codificado para realizar a amplificação da sequência genic-alvo do DNA desta espécie.



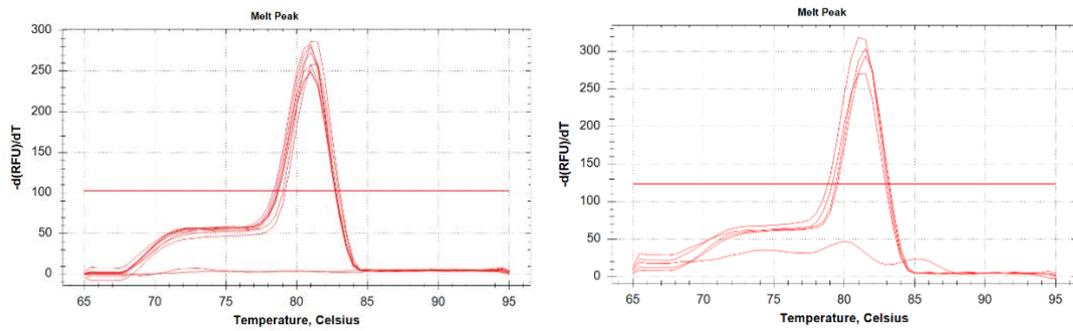
**Figura 14.** Grupo etanol tempo de 0 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da *Astyanax lacustris*.



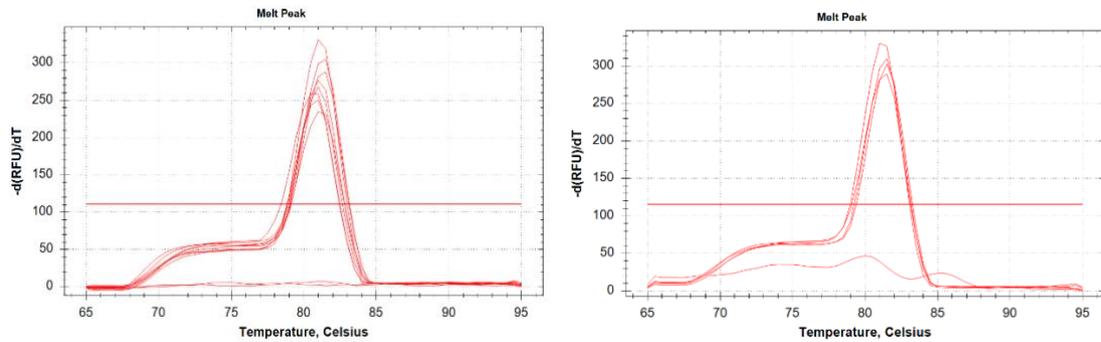
**Figura 15.** Grupo etanol com tempo de 12 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da *Astyanax lacustris*.



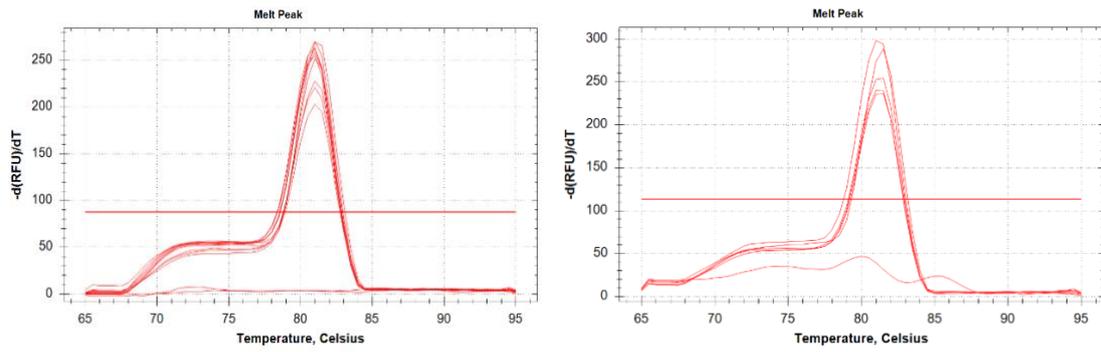
**Figura 16.** Grupo etanol com tempo de 24 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da *Astyanax lacustris*.



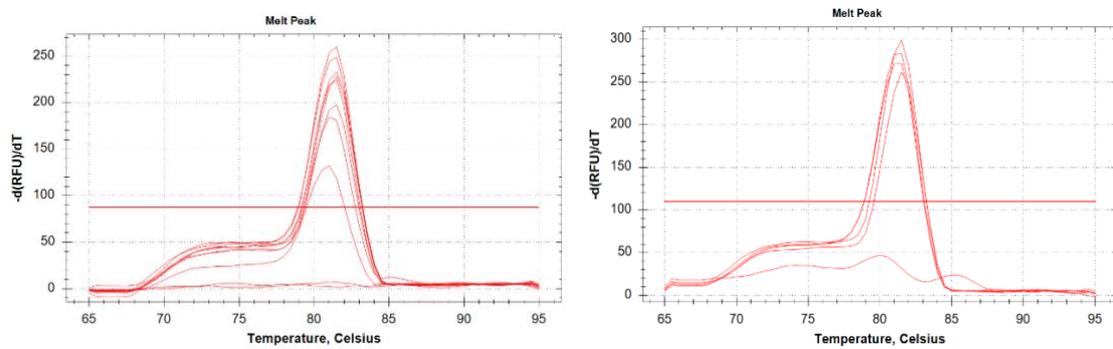
**Figura 17.** Grupo etanol com tempo 48 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da *Astyanax lacustris*.



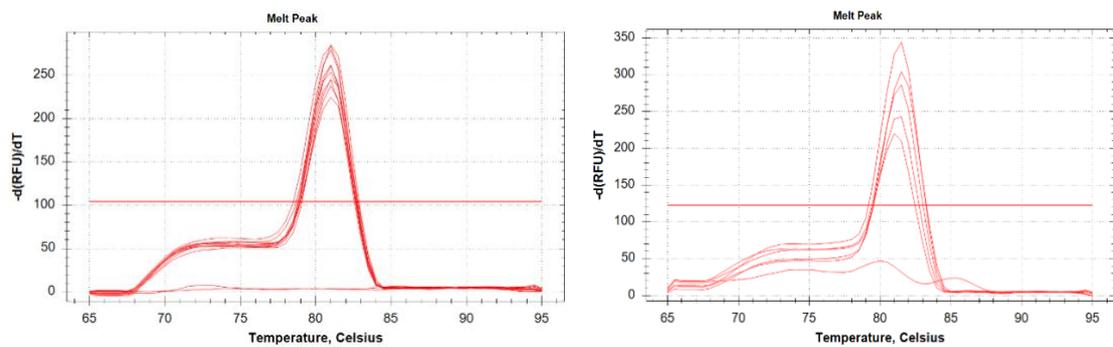
**Figura 18.** Grupo Tween com tempo 0 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a da *Astyanax lacustris*.



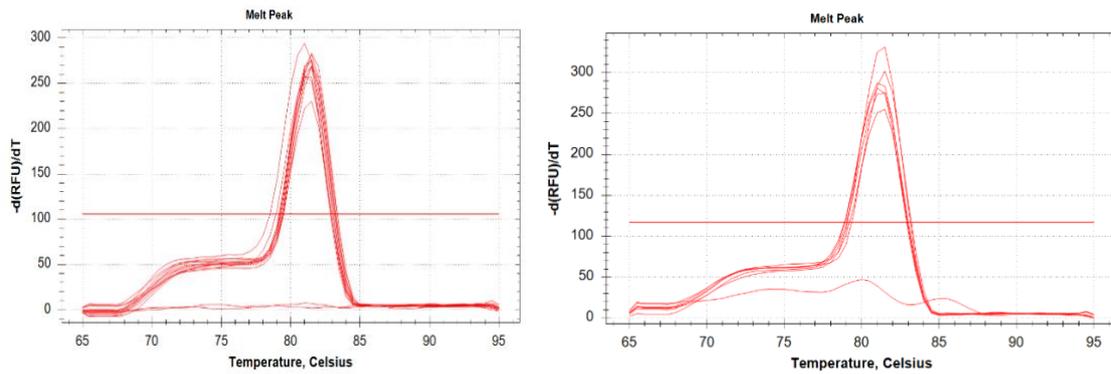
**Figura 19.** Grupo Tween com tempo 12 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a para *Astyanax lacustris*.



**Figura 20.** Grupo Tween com tempo de 24 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a para *Astyanax lacustris*.



**Figura 21.** Grupo Tween com tempo de 48 com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a para *Astyanax lacustris*.



**Figura 22.** Grupo controle com gene da Enzima HSP 70 e gene de referência Ef1a para *Astyanax lacustris*.

As figuras de 15 a 22 mostra a expressão gênica no diferentes tratamentos e tempo. Nelas podemos observar que o comportamento da expressão gênica da enzima HSP 70 no fígado da *Astyanax lacustris*. Não teve variação de animal para animal e nem de tratamento/tempo. Neste caso foi realizado uma replicata de cada animal para a confiabilidade das análises e garantir que não houve erro de pipetagem. Também foi realizado duas amostras controle sem material genético para garantir a confiabilidade da expressão gênica realizada. Como podemos analisar nas figuras acima. Além disso foi realizado um teste com um gene referência desta espécie de peixe para garantir a confiabilidade dos resultados das expressões gênicas.

A falta de sequências genéticas desta espécie atrapalha o uso de abordagens de biologia molecular mais sensíveis para avaliar o perfil da expressão genética e identificar biomarcadores de contaminação, como a Reação de Cadeia de Polimerase Quantitativa de Transcrição Reversa (qPCR) e técnicas de Microarray (KUMAR & KOCOUR, 2017).

Ademais, estudos realizados utilizando a expressão gênica da enzima HSP 70 como medidor de estresse celular em peixes, demonstram aumento nos

níveis de expressão enzimática quando expostos a poluentes ambientais, como metais pesados e pesticidas (PADMINI; USHA RANI, 2008; FARAG et al., 2022). Nota-se que o óleo essencial de *Lippia alba* não induziu nenhum nível de estresse nos organismos, desde molecular até comportamental, evidencia assim o seu potencial como anestésico para peixes sem causar danos na expressão da enzima HSP70.

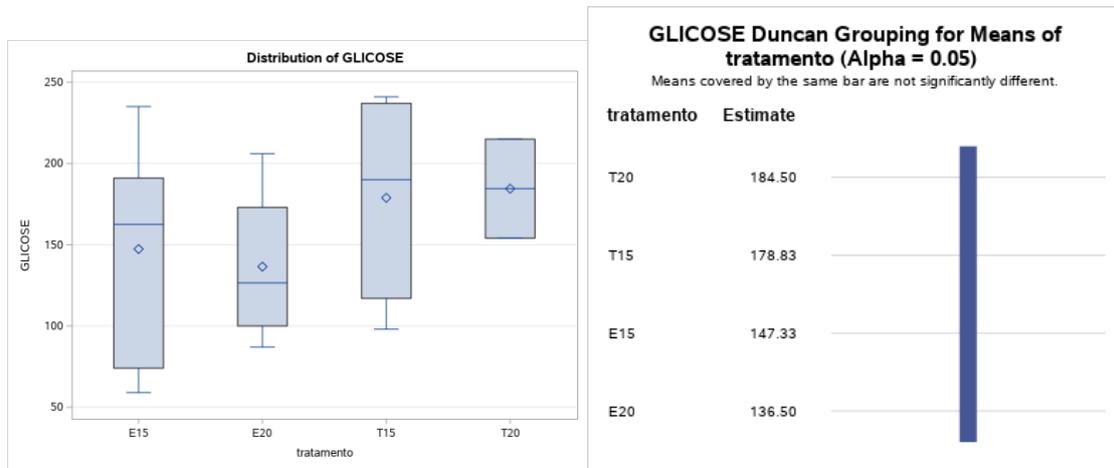
#### 4.4 ANÁLISE DO EXPERIMENTO II

Quando elevamos o tempo de exposição para 15 minutos a maioria atingiu o estágio IV – morte, foram 12 animais exposto a 15 minutos do anestésico 250 µg/L a morte dos animais atingiu 66,66% e quando aumentamos o tempo para 20 minutos o risco de atingir o estágio IV não pareceu ter um impacto tão grande, mas podemos observar que a exposição acima de 10 minutos nesta concentração não parece ser segura para esta espécie de peixe.

Nos animais expostos a anestesia a 20 minutos não foi possível coletar todo sangue necessário para análise. Devido a morte do animal a coleta de sangue não foi viável para todas as análises, ficando o cortisol da anestesia no tempo de 20 minutos sem analisar.. O que torna inviável uso desta concentração de 250 µg/L em uma exposição a mais de 10 minutos para a espécie *Astyanax lacustres*.

Quando se expõe o animal a mais tempo de exposição, 15 minutos, tanto com diluente etanol quanto o diluente T20, conseguimos observar claramente a que atingiu o estágio IV (morte, tabela 1) mais de 66% da amostra.

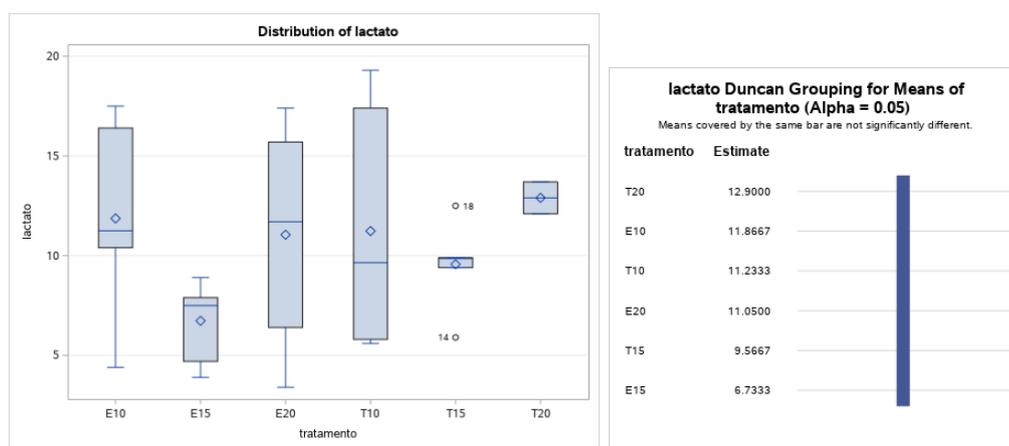
De acordo com a glicose observamos:



**Figura 23.** Apresentação dos dados do valor da glicose por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 E 20 minutos e suas médias. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). E110 = Etanol com tempo anestésico de 10, 15, 20 minutos; T10 = Tween20 com tempo anestésico de 10,15 E 20 minutos;

Na figura acima observamos que não houve diferença das médias da Glicose nos diferentes tratamentos 10, 15 e 20 minutos com dispersantes T20 e Etanol Portanto, o aumento de tempo de exposição seja ele com diluente T20 ou Etanol nesta concentração, para esta espécie não interfere para aumento ou diminuição de glicose plasmática.

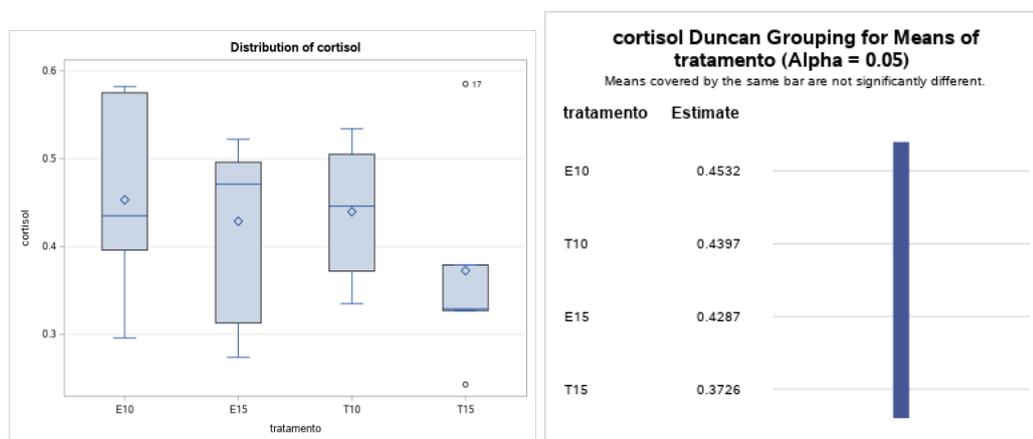
Em relação ao lactato observamos o seguinte resultado



**Figura 24.** Apresentação dos dados do valor da lactato por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 E 20 minutos e suas médias. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). E110 = Etanol com tempo anestésico de 10, 15, 20 minutos; T10 = Tween20 com tempo anestésico de 10,15 E 20 minutos;

Na figura 24 observamos que não existe uma diferença estatística nos grupos estudados seja ele com tempo de 10, 15 ou 20 minutos dos animais submetidos ao experimento. Também não houve diferença entre os grupos diluídos com etanol ou T20. Podemos observar que o aumento do tempo após a anestesia com OELP parece não influenciar no aumento do lactato.

Em relação ao cortisol observamos os seguintes dados estatísticos.



**Figura 25.** Apresentação dos dados do valor do cortisol por tipo de tratamento com tempo anestésico de 10, 15 E 20 minutos e suas médias. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) e posteriormente o teste Duncan para comparação das médias ( $p \leq 0,05$ ). E110 = Etanol com tempo anestésico de 10e 15 minutos; T10 = Tween20 com tempo anestésico de 10 e 15 minutos;

Podemos observar na figura 25 que não houve diferença estatística entre os tratamentos e entre o tempo de exposição em 10 ou 15 minutos. O cortisol no tempo de 20 minutos de exposição ao anestésico não foi possível medir devido à grande morte dos peixes no tempo de 20 e ficou inviável coletar o material visto que o cortisol é analisado no plasma do animal, a quantidade e qualidade da amostra coletada era insuficiente, ou coagulava antes da coleta, ou a amostra hemolisava.

## 5. CONCLUSÃO.

De acordo com o estudo foi possível concluir que o uso de anestésico OELA não leva o animal ao estresse na concentração de 250 µg/L a 10 minutos de indução anestésica, não houve nenhuma morte, resultados como glicose não teve diferença estatística significativa em relação ao grupo controle que não foi submetido a anestésias. O lactato observou-se uma diminuição em relação ao grupo controle x submetidos a anestésicos. Já o cortisol teve um aumento nos grupos anestesiados com OELA em relação ao grupo controle.

Em relação ao tempo para atingir os estágios de anestesia, apenas no estágio II houve diferença estatística, que demonstra que o T20 é mais eficaz que o etanol. Em relação a outros estágios não foi observado diferença estatísticas, quanto ao tempo de recuperação também foi indiferente Etanol x álcool.

Resultado quanto a expressão génica da enzima HSP 70 não foi evidenciado diferença estatísticas entre o grupo controle e os grupos estudados, o que sugere que para este estudo não existe evidencia que os anestésicos utilizados aumentem a expressão génica da enzima HSP 70 no fígado da *Astyanax lacustres*.

Conclui-se que uso de OELA é seguro na dosagem de 250 µg/L em uma exposição de 10 minutos aos animais estudados, quando aumentamos o tempo de exposição a mais de 10 minutos se torna altamente estressante para o animal e até letal com índice de morte a mais de 66%. Para aumentar o tempo de exposição além de 10 minutos seria necessário novos estudos com outras concentrações menores para que possa dizer qual concentração do OELA é segurança para a espécie *Astyanax lacustres* em um tempo superior a 10 minutos de exposição.

## BIBLIOGRAFIA

Adams, RP., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Copyright.

Asadi, MS, Gharaei, A, Harijani, JM, Arshadi, A A, 2018. Comparison between dietary effects of Cuminum cyminum essential oil and Cuminum cyminum essential oil, loaded with iron nanoparticles, on growth performance, immunity and antioxidant indicators of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Nutrition.

Almeida, APG, Correia, TG, Heinzmann, BM, Val, AL, Baldisserotto, B, 2019. Stress-reducing and anesthetic effects of the essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* on *Serrasalmus eigenmanni* (Characiformes: Serrasalminidae). Neotrop. Ichthyol.

Almeida, APG, Heinzmann BM, Val AL, Baldisserotto B, 2018. Essential oils and eugenol as anesthetics for *Serrasalmus rhombeus*. Bol Inst Pesca.

Awad, E, Awaad, A, 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish and Shellfish Immunology.

Azambuja, CR, Mattiazzi, J, Riffel, APK, Finamor, IA, Garcia, LO, Heldwein, CG, Heinzmann, BM, Baldisserotto, B, Pavanato, MA, Llesuy, SF, 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. Aquaculture.

Baldisserotto, B, Gomes, LC, 2013. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil (2 ed, ver. E ampl. Santa Maria.

Bandeira Junior, GS, Baldissera , CF, Descovi, MD, Silveira SN, Tasca, BP, Mourão C, Vargas RHV, Castagna, AP, Baldisserotto, B, 2019. Plant essential oils against bacteria isolated from fish: an in vitro screening and in vivo efficacy of *Lippia organoides*. Ciência Rural.

Barton, BA, 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology.

Barton, BA, Iwama, GK, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and affects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases.

Barton, BA, 1997. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: Iwana, GK, Pickering, AD, Sumpter, JP, Schreck, CB, (Org). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press.

Blanco, BEBV, Vázquez, FJS, 2009. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*.

Benovit, SC, Gressler, LT, Silva, LL, Garcia, LO, Okamoto, MH, Pedron, JS, Sampaio LA., Rodrigues, RV, 2012 Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*.

Carneiro, PCF., Martins, ML, Urbinati, EC., 2002. Transport with diferente benzocaïne concentrations an its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869)(Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*.

Cunha, JAD., Scheeren, CÁ, Salbego, J, Gressler, LT, Madaloz, LM, Bandeira-Junior, G, Bianchini, AE, Pinheiro, CG, Bordignon, SAL, Heizmann, BM, Baldisserotto, B, 2017. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotropical Ichthyology*.

Cunha, MA, 2007. Anestesia em Jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Produção Animal. Universidade Federal de Santa Maria.

Cunha, MA, Zeppenfeld, CC, Garcia, LO, Loro, VL, Fonseca, MB, Emanuelli, T, Veeck, APL, Copatti, CE, Baldisserotto, B, 2010. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*.

Dal Pont G, 2012. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae* . [Dissertação de mestrado]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná.

Davidson, GW, Davie PS, Young G, Fowler RT, 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with Aqui- SK. *Journal of the World Aquaculture Society*.

Dias, KGA., Dias, MI, Müller, AC, De Almeida, RJ, Silva, R.K., De Azevedo, GP, De León, VD, 2018. Uma nova espécie de *Wallinia* Pearse , 1920 (Digenea : Allocreadiidae) coletada de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) e *A. lacustris* Lucena e Soares, 2016 (Characiformes : Characidae) no Brasil baseada em morfologia e sequências de DNA Parasitol.

Elfiyani, R, Amalia, A, Pratama, SY, 2017. Effect of Using the Combination of Tween 80 and Ethanol on the Forming and Physical Stability of Microemulsion of Eucalyptus Oil as Antibacterial. *Journal of Young Pharmacists*.

Eschmeyer, WN, Fong JD, 2016. Espécies por família / subfamília no Catálogo de Peixes. São Francisco. California Academy of Sciences.

Façanha, MF, Gomes, L, 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma maropomum*, Characiformes: characidadae). *Acta Amazonica*.

Farag MR, Alagawany M, Khalil SR, El-Hady EW, Elhady WM, Ismail TA, Marini C, Di Cerbo A, Abdel-Latif HMR, 2022. Behavioral, physiological, and inflammatory responses of *Oreochromis niloticus* fish exposed to thallium and/or supplementation with *Astragalus membranaceus* polysaccharides. *Aquaculture*.

Foresti, FP, Almeida RC, Forsti F, 2005. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Baldisserotto, B, Gomes, LC, *Espécies nativas para a Piscicultura no Brasil*. Santa Maria, RS: UFSM.

Garutti, V, 2003. *Piscicultura Ecológica*. São Paulo, SP: Fundação Editora da UNESP.

Ghelichpour M, Rajabiesterabadi H, Hoseini SM, 2016. Características histopatológicas de brânquias de alevinos de baratas do Cáspio (*Rutilus rutilus caspicus*) tratados com permanganato de potássio e formalina. *Aquaculture*.

Gimbo, RY, 2008. Diferentes concentrações de Benzocaína na indução anestésico do Tambari-do-Raboamarelo (*Astyanax Altiparanae*) Ver. Brasileira de Saúde e produção Animal.

Gonçalves LU, Parisi G, Bonelli A, Sussel FR, Viegas EMM, 2012 The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquac Res*.

Hennebelle, T, Sahpaz, S, Joseph, H, Bailleul, F, 2008 Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*

Herrero, MJ, Madrid, JA, Sánchez-Vázquez FJ, 2003. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiology International*.

Hoshiba, MA, Gonçalves FD, Urbintat, EC, 2009. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura Physiological stress responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after chasing.

Hohlenwerger, JC., Copatti, EC., Sena, CA., Couto, D.R., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Caron, B.O., Schmidt, D., 2016. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cos-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)?. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*.

Hoseini, SM, Taheri Mirghaed, A, Yousefi, M., 2019. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.

Koakoski, G, Oliveira, TA, Rosa, GS, Fagundes, M, Kreutz, LC, Barcelos, LJG, 2012. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiology & Behavior*.

Kumar G, Kocour G, 2017. Aplicações de sequenciamento de próxima geração em pesquisa pesqueira : uma revisão. *Peixe. Res.*

Mommsen, TP, Vijayan, MM, Moon, TW, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.

Netto, JDL, Oliveira, RS, Copatti, CE, 2017. Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation and anaesthesia of Nile tilapia juveniles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

NIST 2005. Mass Spectral Library. NIST Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d). Gaithersburg, MD.: The NIST Mass Spectrometry Data Center.

Orsi ML, 2010. Estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do Rio Paranapanema, reservatório de Capivara. São Paulo: Blucher.

Ostrensky, A, Pedrazzani, AS, Vicente AL, 2015. Uso de MS-222 (metanossulfonato de triclaína) e propofol (2, 6-diisopropilfenol) como anestésicos para o tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Aquaculture Research*.

Padmini, E, Usha Rani, M, 2008. Impact of seasonal variation on HSP70 expression quantitated in stressed fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*.

Pankhurst, NW, 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*.

Parodi, TV, Cunha, MA, Heldwein, CG, Souza, DM, De Martins, AC, Garcia, LO, Wasielesky, WJR, Monserrat, JM, Schmidt, D, Caron, BO, Heinzmann, B, Baldisserotto, B, 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*.

Park, MO, Hur, WJ, Im, SY, Seol, DW, Lee, J. Park, IS, 2008. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research*.

Pascoal, ME, Slowing, K, Carretero, E, Sánchez MD, Villar, A, 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*.

Postay, LF, Cabral, DS, Heringer, OA, Vieira, LV, Moraes, LR, Freitas, G, Gomes, LG, 2019. Surfactants during anesthesia of tilapia (*Oreochromis niloticus*) with

essential oil of *Lippia alba*: effectiveness for fish and toxicity for fish and mammal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Vila Velha, ES, Brasil.

Rodrigues, APP, Rosa, MD, Fewrreira, EC, Francisco, DD, 2012. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Ramdia quelen*) and Nilo Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*.

Ross, LG, Ross, B, 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science. ROUBACH, R., GOMES, L.C., FONSECA, F.A.L. and VAL, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*.

Saccol, EMH, Uczay, TS. Pês, IA, Finamor, GM, Ourique, APK, Riffel, D. Schmidt, BO, Caron, BM, 2013. Heinzmann, S. F. Llesuy, R. Lazzari, B. Baldisserotto E M. A. Pavanato. Addition of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and

Salbego, J, Becker, AG, Gonçalves, JF, Menezes, CC, Heldwein, CG, Spanevello, RM, Loro, VL, Schetinger, MRC, 2014. The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotropical Ichthyology*.

Salbego, J, Tonib, C, Beckerc, AG, Zeppenfelda, CC, Menezesd, CC, Lorod, VL, Heinzmanne BM., Baldisserottoa, B, 2017 Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. Brazil. *Jornal. Biologia*.

Small BC, 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*.

Silva, DHS, Silva, APS, Silveira, NA, Silveira, RV, 2015. Os efeitos da temperatura e do busulfan (Myleran) na espermatogênese de tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Theriogenology*.

Silva, EMP, Oliveira, RHF, Ribeiro, MAR, Coppola, MP, 2009. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural*.

Silva, LL, Parodi, TV, Reckziegel, P, Garcia, VO, Bürger, ME, Baldisserotto, B, Malmann, CA, Pereira, MAS, Heinzmann, BM, 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effect, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*.

Silva, RDR, Oliveira L, Fortes, BDAI, Vieira, D, Fioravanti, MCS, 2012. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Soares, BV, Dias MT, 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. *Biota Amazônia*.

Soto, C, Burhanulddin, S, 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length a weight of rabbitfish (*siganus lineatus*). *Aquaculture*.

Souza, CF, Salbego, J, Gressler, LT, Golombieski, JL, Ferst, JG, Cunha, MA., Heinzmann, BM, Caron, BO, Glanzner, WG, Gonçalves, PBD, Baldisserotto, B, 2017. *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. *Neotropical Ichthyology*, 13, p.

Souza, CF., Baldissera, MD, Salbego, J, Lopes, J, Vaucher, RA, Mourão, R, Caron, BO, Heinzmann, BM, Baldisserotto, B, 2017. Physiological responses of silver catfish to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*.

Schulz, UH, E, Leuchtenberger, C, 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Brazilian Journal Biology*.

Súarez, YR, Silva, EA, Viana, LF, 2017 *Biologia reprodutiva de Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) na planície alagada do Pantanal sul, bacia do rio Alto Paraguai, Brasil. *Environ Biol Fish*.

Summerfelt, RC, Smith, LS, Anesthesia, Surgery And Related Techniques. In: Schreck, CB, Moyle, PB, 1990. (Org). *Methods for Fish Biology*. Bethesda: American Fisheries Society.

Terblanche, FC, Kornelius, G, 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. *Journal of Essential Oil Research*.

Toni, C, Martos-Sitcha, JA, Baldisserotto, B, Heinzmann, BM, Silva, LL, Rodríguez, GM, Mancera, JM, 2015. Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of *Lippia alba* on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Research in Veterinary Science*.

Vera, LM, De Pedro, N, Gómez-Milán, E, Delgado, MJ, SánchezMuros, MJ, Madrid, JÁ, Sanchez-Vázquez, FJ, 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology Behavior*.

Vicente, AL, 2014. Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000). [Dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

Wagner, GN, Singer TD, Mckinley RS, 2003. The ability of clove oil and MS – 222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*.

Weber, ES, 2011. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *Vet Clin Exot Anim*

Wedeyer, GA, Barton, BA, Mcleay, DJ, 1990. Stress and acclimation, In. Schreck, CB, Moyle, PB, (eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society Bethesda, Maryland.

Yamamoto PY, Colombo CA, Azevedo Filho JÁ, Lourenção AL, Marques MOM, Morais GDS, Chiorato AF, Martins ALM, Siqueira WJ, 2008. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. *Scientia Agricola*.

Zahl, IH, Kiessling, A, Samuelsen, OB, Olsen, RE, 2010. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*.

Zeppenfeld, CC, Hernández, DR, Santinón, JJ, Heinzmann, BM, da Cunha, M A, Schmidt, D, E Baldisserotto, B, 2016. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*,

Zétola, M, Lima, TCM, Sonaglio, D, González, OG, Limberger, RL, Petrovick, PR, Bassani, VL, 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from lippie alba – *Verbenaceae* (Brazilian false melisse). *Journal of Ethnopharmacology*.