



Serviço Público
Federal

Ministério da
Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA*
ORIGANOIDES NA DIETA, MANEJO E TRANSPORTE DE
*PACUS PIARACTUS MESOPOTAMICUS***

Rômulo Guilherme dos Santos Almeida

CAMPO GRANDE, MS
2024



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



2024

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* NA
DIETA, MANEJO E TRANSPORTE DE *PACUS PIARACTUS*
MESOPOTAMICUS

ALMEIDA, R. G. S



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO
SUL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL CURSO DE
DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA
ORIGANOIDES* NA DIETA, MANEJO E
TRANSPORTE DE PACUS *PIARACTUS
MESOPOTAMICUS***

Evaluation of *lippia origanoides* essential oil in the diet, management and
transport of pacus *Piaractus mesopotamicus*

Rômulo Guilherme dos Santos Almeida

Orientador: Prof. Dr. Cristiane Meldau de Campos

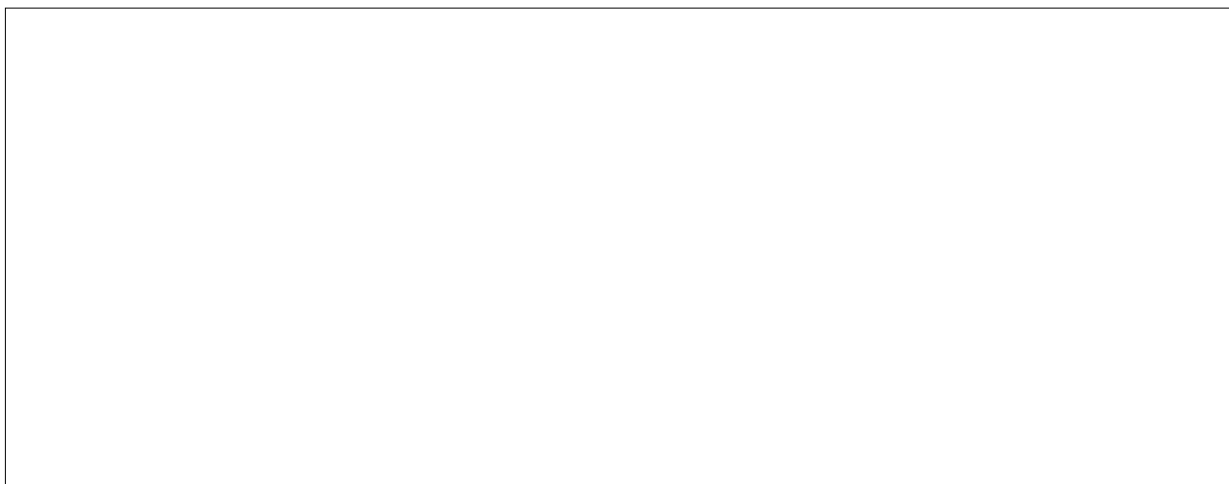
Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito à obtenção do título
de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção
Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2024



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Ficha catalográfica elaborada pelo setor de biblioteca Central da UFMS.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

RÔMULLO GUILHERME DOS SANTOS ALMEIDA

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES* NA DIETA, MANEJO E TRANSPORTE
DE PACUS *PIARACTUS MESOPOTAMICUS*

EVALUATION OF *LIPPIA ORIGANOIDES* ESSENTIAL OIL IN THE DIET, MANAGEMENT AND
TRANSPORT OF PACUS *PIARACTUS MESOPOTAMICUS*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito para obtenção do título
de Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 30-10-2024

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Cristiane Fatima Meldau de Campos
(UEMS) – Presidente

Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(UFMS)

Dra. Claucia Aparecida Honorato da Silva
(UFGD)

Dra. Deliane Cristina Costa
(UEMS)

Dr. Jayme Aparecido Povh
(UFMS)

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Eurico dos Santos Fernandes, Professor do Magisterio Superior**, em
05/11/2024, às 09:56, conforme horário oficial de Mato

Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Jayme Aparecido Povh, Professor do Magisterio Superior**, em 05/11/2024, às 10:46, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Deliane Cristina Costa, Usuário Externo**, em 05/11/2024, às 13:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Claucia Aparecida Honorato da Silva, Usuário Externo**, em 05/11/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral, Usuário Externo**, em 06/11/2024, às 16:59, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5228560** e o código CRC **B0CFFD8C**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 5228560



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Dedico

*A Deus, por me prover, a força de vontade, saúde e humildade necessária para completar
mais esse ciclo na vida.*

*Aos meus pais pelo apoio, amor, dedicação e investimento sempre a mim fornecido e aos
meus irmãos, pelo apoio e atenção a mim dedicado sempre quando necessário.*



AGRADECIMENTOS

A Deus, guia, fonte de perseverança e auxílio para não desistir e continuar seguindo em frente em meio aos desafios.

A meus amados pais, que dedicaram a vida na criação dos filhos, muitas vezes priorizando o nosso bem-estar em relação aos próprios, sempre guiando para o caminho mais correto e incentivando em buscar nossos sonhos. Obrigado mãe por todo apoio, preocupação, amor e dedicação, e obrigado pai que da mesma forma sempre apoio, se dedicou, se preocupou e nos amou e sei que continua assim. Obrigado por tudo, amo vocês.

Aos meus irmãos, por estarem sempre presentes seja qual for o momento, com todo apoio, incentivo e amor. Amo vocês.

À Profª Drª Cristiane Meldau, por toda orientação nessa trajetória, apoio, paciência, ensinamentos, críticas e incentivos construtivos e tempo dedicado a mim, que nunca irei esquecer.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), o programa de pós-graduação em ciência animal, assim como, a todos os docentes e funcionários, que fizeram parte de minha trajetória. Obrigado pela oportunidade de cursar uma pós-graduação.

Aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa Peixe Sempre, por todo auxílio e amizade durante o período da tese.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, assim como, os funcionários do setor de piscicultura, que tanto auxiliaram na realização do trabalho.

Ao Dr. Andre Lima Ferreira, por toda amizade, cooperação no planejamento, execução dos trabalhos, conselhos disponibilidade e orientações para finalização dos trabalhos, nunca irei esquecer.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Aos Prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes, Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh, por todo auxílio, conselhos, disponibilidade, ensinamentos e espaço no laboratório, sempre da melhor forma e quando necessário.

A Prof^a Dr^a Claudia Andrea Lima Cardoso pela disponibilidade para com as análises de compostos residuais.

À Rúbia Mara Acunha, Kathianne Oliveira, Nayara Pompiani e Nandara Oliveira por toda a ajuda, amizade, disponibilidade e parceria em todos os momentos de trabalho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente no desenvolvimento desta tese.

OBRIGADO.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci



Resumo

ALMEIDA, R.G.S. Avaliação do óleo essencial de *Lippia origanoides* na dieta, manejo e transporte de pacus *Piaractus mesopotamicus*. 2024. 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

A constante busca por aditivos fitoterápicos que funcionem como sedativos, anestésicos e imunostimulantes, pode funcionar como alternativa à utilização de produtos quimioterápicos e antimicrobianos, que podem aumentar os custos da produção, com possível contaminação da carne, do meio ambiente e ocasionar o surgimento de patógenos resistentes. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos no desempenho zootécnico, anestésicos e como sedativo do óleo essencial de *Lippia origanoides* para o pacu *Piaractus mesopotamicus* uma espécie de importância comercial para a aquicultura brasileira, mediante avaliação do crescimento, da taxa de sobrevivência acumulada, hematológica, imunológica, bioquímica, deposição residual e alterações histológicas das brânquias. No capítulo 2 foi avaliado o efeito imunostimulante do óleo essencial de *Lippia origanoides* na taxa de sobrevivência acumulada pós desafio térmico de juvenis de pacu *P. mesopotamicus*. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) para o desempenho zootécnico entre os tratamentos. Após o desafio não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) na taxa de sobrevivência acumulada, no entanto com variação dos valores médio para 1,5 e 2,0 mL kg⁻¹ do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO). O OELO entre 1,0 e 2,0 mL kg⁻¹ não afeta desempenho zootécnico, porém 2,0 mL kg⁻¹ de OELO demonstrou potencial de redução da taxa de mortalidade absoluta. No capítulo 3 foram determinados os efeitos hematológicos e modulação da frequência ventilatória do óleo essencial de *L. origanoides* como anestésico para pacus. Foram determinados os tempos de indução e recuperação anestésica e a frequência ventilatória (FV) dos peixes ($n= 48$; 29,94±6,69 g) em diferentes concentrações de EOLO (0, 25, 50, 100, 200 e 400 µL L⁻¹). De acordo com os resultados do primeiro ensaio experimental foi realizada um novo ensaio ($n= 36$; 29,25 ± 5,90 g), foram avaliados os efeitos de 0, 50 e 200 µL L⁻¹ nos tempos (1 hora e 24 horas pós-indução). A maioria das variáveis sanguíneas retornaram a níveis considerados normais para a espécie 24 horas após a anestesia. Portanto, uma concentração EOLO de 200 µL L⁻¹ pode ser considerada segura para uso antes do manejo biométrico de *P. mesopotamicus*. No capítulo 4 foram avaliados os efeitos do EOLO (0, 5, 10, 15 e 20 µL L⁻¹) na água do transporte (4 horas) de pacu *P. mesopotamicus*, sob as variáveis hematológicas, imunológicas, bioquímica, de depleção residual e avaliação histológica das brânquias. Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) para a maioria dos parâmetros hematológicos entre os peixes transportados em relação aos peixes não transportados, os eritrócitos foram diferentes ($p<0,05$), entre 5 µL L⁻¹ de EOLO em relação ao 0 µL L⁻¹ de EOLO. Leucócitos foram mais elevados nos tratamentos 10 e 20 µL L⁻¹ ($p<0,05$) e trombócitos 15 e 20 µL L⁻¹. Na análise residual foi identificado o carvacrol (µg kg⁻¹) nos tratamentos com a inclusão do EOLO, após 48 horas do transporte não foi detectado carvacrol em nenhum dos tratamentos estudados. Não foram observadas diferenças ($p> 0,05$) entre os tratamentos para alterações histológicas nas brânquias.

Palavras-chave: Carvacrol; depleção residual; desempenho; estresse; hematologia; sedação



Abstract

ALMEIDA, R.G.S. Evaluation of *Lippia origanoides* essential oil in the diet, transport and management of pacu *Piaractus mesopotamicus*. 2024. 100 f. Tese(Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

The constant search for phytotherapeutic additives that function as immunostimulants, improving the resistance of fish to health and management challenges and resulting in greater zootechnical performance of the animals, can function as an alternative to the use of chemotherapeutic and antimicrobial products. Chemotherapy drugs can increase production costs, with possible contamination of meat and water that is released into the environment and lead to the emergence of pathogens resistant to these drugs. Therefore, this study aimed to evaluate the effects on zootechnical performance, anesthetics and as a sedative of *Lippia origanoides* essential oil for the pacu *Piaractus mesopotamicus*, a species of commercial importance for Brazilian aquaculture, by evaluating growth, accumulated survival rate, hematological, immunological, biochemical, residual deposition and histological changes of the gills. Chapter 2 evaluated the zootechnical performance and cumulative survival rate after thermal challenge of juvenile pacu *P. mesopotamicus*. No differences ($p>0.05$) were observed for zootechnical performance between treatments. After the challenge, no significant differences ($p>0.05$) were observed in the cumulative survival rate, only in the absolute values for 1.5 and 2.0 mL kg⁻¹ of *Lippia origanoides* essential oil (OELO). The OELO between 1.0 and 2.0 mL kg⁻¹ does not affect zootechnical performance, however 2.0 mL kg⁻¹ of OELO demonstrated potential to reduce the absolute mortality rate. In chapter 3, the hematological effects and modulation of the ventilatory frequency of the OELO as an anesthetic for pacus were determined. The anesthetic induction and recovery times and the ventilatory frequency (VF) of the fish ($n = 48$; 29.94 ± 6.69 g) were determined at different concentrations of OELO (0, 25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{L L}^{-1}$). According to the results of the first experimental trial, a new trial was carried out ($n = 36$; 29.25 ± 5.90 g), evaluating the effects of 0, 50 and 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ at different times (1 hour and 24 hours post-induction). Most blood variables returned to levels considered normal for the species 24 hours after anesthesia. Therefore, an OELO concentration of 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ can be considered safe for use before biometric handling of *P. mesopotamicus*. In chapter 4, the effects of OELO (0, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{L L}^{-1}$) in the transport water (4 hours) of pacu *P. mesopotamicus* were evaluated on hematological, immunological, biochemical, residual depletion and histological evaluation of the gills variables. No differences ($p>0.05$) were observed for hematological parameters between treated fish in relation to non-transported fish, erythrocytes were different ($p<0.05$) between 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ of OELO in relation to 0 $\mu\text{L L}^{-1}$ of OELO. Leukocytes were higher in treatments 10 and 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($p<0.05$) and thrombocytes 15 and 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. In the residual analysis, carvacrol was identified ($\mu\text{g kg}^{-1}$); after 48 hours of transport, carvacrol was not detected in any of the treatments studied. No differences ($p>0.05$) were observed between treatments for histological changes in the gills.

Keywords: Carvacrol; stress; hematology; residual depletion; performance; sedation



Lista de ilustrações

Capítulo 1

Figura 1- Espécie <i>Lippia origanoides</i>	30
--	----

Capítulo 2

Figura 1- Delineamento e procedimento experimental da avaliação do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> em diferentes concentrações na dieta de juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	49
---	----

Figura 2- Presença de ectoparasitos em brânquias (A) e tegumento (B) de juvenis de pacus submetidos a desafio térmico após suplementação dietética de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey - $p < 0,05$).....	53
--	----

Capítulo 3

Figura 1- Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO) determinada através de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).....	66
--	----

Figura 2- Delineamento e procedimento experimental da avaliação do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> como anestésico para juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	67
--	----

Figura 3- Delineamento e procedimento experimental do segundo ensaio anestésico da avaliação do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> em diferentes concentrações como anestésico sob as variáveis hematológicas de juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	69
--	----

Figura 4- Tempo necessário para indução anestésica (A) e recuperação (B) de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO). Os dados foram analisados por análises de regressão ($p < 0,05$). Estrelas representam o valor estimado pela equação derivada.....	70
--	----

Capítulo 4

Figura 1- Delineamento experimental de juvenis de pacu <i>P. mesopotamicus</i> transportados com água contendo diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	88
---	----

Figura 2- Composição química do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	92
--	----

Figura 3- Concentração de carvacrol $\mu\text{g kg}^{-1}$ no músculo de juvenis de pacus transportados com água contendo óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	97
---	----



Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1- Comportamento e fases da anestesia.....	23
--	----

Tabela 2- Efeitos dos óleos essenciais e seus constituintes em diferentes funções e espécies de peixes.....	26
--	----

Capítulo 2

Tabela 1- Parâmetros de desempenho zootécnico (Média $\pm$ Desvio padrão) de juvenis de pacu após 75 dias de suplementação com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> via dieta.....	52
--	----

Capítulo 3

Tabela 1- Valores (média $\pm$ desvio padrão) da frequência de ventilação (batimentos operculares por minuto) durante a indução e recuperação da anestesia em <i>Piaractus mesopotamicus</i> , submetidos a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO). Médias seguidas de letras diferentes em uma coluna diferem pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).....	71
--	----

Tabela 2- Valores (média $\pm$ desvio padrão) das variáveis bioquímicas e hematológicas em dois tempos de coleta de sangue para <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto a diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO). Médias seguidas de letras diferentes em uma coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Grupo controle: 2000 μL de álcool L^{-1} ; Hemoglobina (Hem), Hematócrito (Hemat), Eritrócitos (Eri), Leucócitos (Leu), Volume corpuscular médio (VCM), Concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) e Hemoglobina corpuscular média (HCM); CV = Coeficiente de variação.....	72
--	----

Capítulo 4

Tabela 1- Variáveis de qualidade da água antes e após 4 h de transporte de juvenis de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu) em sacos plásticos contendo água com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO).....	93
---	----

Tabela 2- Valores (média $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros sanguíneos em três tempos de coleta após 4 h de transporte de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos à diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i>	95
---	----

Tabela 3- Detalhamento da interação para eritrócitos ($\times 10^{-6}$) (média $\pm$ desvio padrão) de juvenis de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu) em 1, 24 e 48 h após transporte com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO).....	96
--	----

Tabela 4- Detalhamento da interação para trombócitos ($\times 10^{-3}$) (média $\pm$ desvio padrão) de juvenis de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu) em 1, 24 e 48 h após transporte com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO).....	96
--	----

Tabela 5- Índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de juvenis de <i>Piaractus</i>	
---	--



<i>mesopotamicus</i> (pacu) transportados com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> (EOLO).....	96
---	----



SUMÁRIO

1- CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Panorama produtivo da aquicultura mundial e nacional.....	17
1.2 Espécie alvo da pesquisa – <i>Piaractus mesopotamicus</i>	18
1.3 Estresse em peixes.....	19
1.4 Imunidade em peixes.....	21
1.5 Anestesia.....	22
1.6 Usos dos óleos essenciais na piscicultura.....	24
1.7 Óleo essencial - <i>Lippia origanoides</i>	29
1.8 Bioacumulação e depleção residual.....	31
2- OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3- REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2.....	43
Avaliação da inclusão dietética do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> como imunoestimulante na taxa de mortalidade de juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) pós desafio de estresse térmico.....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
1. Metodologia.....	48
2. Resultados.....	51
3. Discussão.....	54
4. Conclusões.....	55
5. Referências.....	56
CAPÍTULO 3.....	60
Óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> como anestésico para <i>Piaractus mesopotamicus</i> : implicações nos tempos de indução e recuperação, frequência ventilatória e respostas sanguíneas após manejo biométrico.....	61
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
1. Material e métodos.....	65
2. Resultados.....	70
3. Discussão.....	73
4. Conclusões.....	75
5. Referências bibliográficas.....	75
CAPÍTULO 4.....	82
Óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> no transporte de <i>Piaractus mesopotamicus</i> : Avaliação de compostos residuais, fisiológica e da morfologia branquial.....	82
Resumo.....	83
Abstract.....	84
Introdução.....	85
1. Material e métodos.....	86
2. Resultados.....	92



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



3.	Discussão.....	97
4.	Conclusões.....	102
5.	Referências.....	103

1- CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Panorama produtivo da aquicultura mundial e nacional

No cenário agropecuário global, a produção de peixes se destaca por sua crescente importância e desenvolvimento contínuo, no intuito de atender a demanda das populações, visto que, o pescado é a proteína de origem animal mais produzida no planeta, sendo produzidos aproximadamente 182 milhões de toneladas no ano de 2021, 45% de incremento produtivo desde o ano 2000 (FAO, 2023), provenientes de produções aquícolas e da pesca de captura.

Do total produzido, cerca de 50% foi proveniente da aquicultura, com um incremento produtivo de cerca de 5% ao ano, entre 2000 e 2021. Esse total produzido pelo setor, mostra a importância dessa fonte de nutrientes de alto valor biológico, sendo fonte de renda e meio de subsistência para centenas de milhões de pessoas (Brabo et al., 2016). Estimativas mostram também, que até 2025 a produção global de peixes de cultivo ultrapassará a produção de peixes de captura (Peixe BR, 2024).

Em âmbito global, o Brasil encontra-se entre os 15 maiores produtores de peixes criados em sistemas aquícolas, produzindo em 2021 cerca de 0,650 milhões de toneladas (FAO, 2023). De acordo com dados recentes, o Brasil produziu 655.302,607 toneladas de peixes de cultivo, com crescimento de 5,49% em relação ao ano anterior (IBGE: 2022; 2023). No entanto, mesmo com posição de destaque, o país possui potencial e condições para ampliar ainda mais sua produção, por apresentar extensa disponibilidade hídrica para produção nos diferentes sistemas de cultivo como o intensivo, clima favorável, boa produção de grãos, boa demanda interna e espécies nacionais com potencial zootécnico favorável (Brabo et al., 2016).

Dentre as regiões brasileiras, o Centro-Oeste produziu em 2023 cerca de 110.850 toneladas de peixes de cultivo, com aproximadamente 12,49% da produção nacional (Peixe Br, 2023), com perspectivas positivas de crescimento e incremento produtivo. Com relação aos Estados brasileiros, o Mato Grosso do Sul se destaca como oitavo maior produtor aquícola, com aproximadamente 34.100 toneladas da produção nacional (Peixe Br, 2024), apresentando estimativas positivas de crescimento e incremento produtivo, principalmente de espécies nativas (Brabo et al., 2016; Peixe Br, 2023), com possibilidade de produção em sistemas intensivos, uma vez que, com o incremento da demanda por peixes torna-se necessário a utilização de novas técnicas e tecnologias que permitem o incremento da produção.

Com relação aos sistemas de produção, foram desenvolvidos diversos modelos, técnicas e regimes para gerenciar o incremento da produção aliado a manutenção do meio natural reduzindo os impactos negativos da produção (Morales et al., 2022). Sendo empregados diferentes tipos de sistemas produtivos (intensivo, semi-intensivo e extensivo). Dentre os

regimes de produção na produção piscícola o intensivo é um dos que proporciona maior produtividade, uma vez que, são empregados diferentes tipos de manejos e adoção de tecnologias como, mensuração e manutenção da qualidade de água do meio (Utilização de aeradores), a alimentação é proveniente principalmente por rações artificiais balanceadas, maior investimento em mão-de-obra e elevação da densidade de estocagem (Rodrigues et al., 2013).

1.2 Espécie alvo da pesquisa – *Piaractus mesopotamicus*

Dentre as espécies nativas produzidas no país, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pertence a superordem Ostariophysi, que incluem os peixes com elevado valor comercial para a piscicultura (Urbinati et al., 2013). É uma espécie nativa com ampla distribuição na América do Sul, na bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Urbinati et al., 2013). No Brasil sua distribuição ocorre principalmente nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, no pantanal do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Urbinati et al., 2013). O pacu possui extenso potencial para produção piscícola, pela sua distribuição geográfica no país, rusticidade, fácil adaptação as condições de cultivo e aceitação no mercado consumidor (Signor et al., 2010). É uma das principais espécies nativas da piscicultura nacional, no ano de 2023 sua produção foi cerca de 7.744,018 toneladas juntamente com o patinã (IBGE, 2023).

Como principais características, apresenta corpo robusto com formato arredondado, dorso alto e corpo comprido podendo alcançar 50 cm ou mais de porte, com uma quilha pré-ventral com espinhos possibilitando bons cortes para a indústria (Britsky et al. 2007; Maria et al., 2004; Moro et al., 2013). A porção dorsal é geralmente castanho ou cinza escuro com manchas mais escuras, quando em fase inicial de crescimento a parte ventral é mais clara (Britsky et al. 2007). No ambiente natural seu comportamento alimentar é variável sofrendo flutuações de acordo com as variações ambientais que influencia na disponibilidade de alimento, seu hábito alimentar é onívoro que se alimentando principalmente de folhas, caules, flores, frutos, sementes e de acordo com a oportunidade podem se alimentar de pequenos insetos, aracnídeos, moluscos e peixes. Possui intestino longo, permitindo a permanência do alimento por mais tempo em contato com as enzimas digestivas (Rotta, 2003; Urbinati et al., 2013).

A boca dessa espécie possui dentes molariformes e mandíbulas adaptadas para triturar alimentos, possuem rastros branqueais desenvolvidos permitindo a captura do plâncton (Moro et al., 2013). É um peixe de ambientes lóticos e semi lóticos com desova após uma longa migração durante a estação chuvosa com a cheia dos rios o categorizando como peixe reofílico e atinge a maturidade sexual com cerca de 3 anos, dessa forma, é necessário a indução hormonal para sua reprodução em piscicultura para cultivo (Agostinho et al., 2004; Maria et al., 2004;

Iseki et al., 2008; Urbinati et al., 2013).

Em pesquisas de efeitos de óleo essenciais em peixes, o pacu já foi estudado em trabalhos com diferentes óleos essenciais, como o óleo essencial de *Lippia sidoides* onde Ventura et al. (2019) avaliaram as respostas fisiológicas e farmacocinéticas do peixe durante procedimento de manejo ao óleo essencial como anestésico, e observaram que as concentrações 20 e 70 mg L⁻¹ foram eficientes em induzir sedação e anestesia nos peixes e os parâmetros fisiológicos retornaram aos valores basais após 24 horas do procedimento.

Ventura et al. (2021) avaliaram o óleo essencial de *Ocimum basilicum* como anestésico (100, 350 e 600 mg L⁻¹) dinâmica térmica e fisiológica de pacus após estresse de captura, foi observado efeito quadrático na contagem de linfócitos com pico máximo a 350 mg L⁻¹ do óleo essencial. Durante o experimento a temperatura dos peixes variaram entre 25,9 e 29,9 °C e os peixes com menores temperaturas da superfície corpórea foram os anestesiados com 100 mg L⁻¹, no entanto, o óleo essencial não foi capaz de prevenir alterações hematológicas dos peixes. Moreira et al. (2024) avaliaram a eficácia do óleo essencial do *Zingiber officinale* como anestésico (0, 50, 100, 200 e 400 mg L⁻¹) e sedativo para o transporte (0, 10, 20 e 30 mg L⁻¹) de juvenis de pacu por duas horas. Os autores observaram que a concentração de 200 mg L⁻¹, proporcionou anestesia profunda sem alterações nos parâmetros hematológicos, no transporte a concentração indicada foi a de 30 mg L⁻¹ com efeito sedativo e redução do consumo de oxigênio, mitigando também os efeitos no transporte na alteração da hemoglobina e no hematócrito.

1.3 Estresse em peixes

Durante a produção piscícola os peixes são submetidos aos mais diversos tipos de sistemas produtivos e procedimentos de manejo, que podem levar a quadros de estresse principalmente nas fases iniciais de crescimento, como, sistemas com elevada densidade de estocagem, biometrias com manejo excessivo expondo os animais ao ar por períodos prolongados, perseguição e manuseio dos animais, possíveis períodos de redução do oxigênio dissolvido na água, choques térmicos, deterioração da qualidade da água e o procedimento de transporte dos peixes (Conte, 2004; Herrera et al., 2019; Costa et al., 2011; Sampaio & Freire, 2016; Vanderzwalmen et al., 2018). Esses fatores isolados, assim como sua junção podem levar a redução do desempenho zootécnico, assim como, o estresse e a possível mortalidade dos indivíduos (Simon et al., 2017).

O estresse pode ser definido como uma resposta a um estímulo que influencia na homeostase do organismo negativamente, e a partir da identificação, mensuração e intensidade dessa resposta é possível obter informações da capacidade dos peixes em resistir a morte e

retornar ao seu padrão homeostático (Schreck & Tort, 2016).

Em uma situação de estresse, ocorrem uma série de respostas do organismo do peixe que podem ser classificados em três categorias: Primário, secundário e terciário. A primária ocorre a partir da resposta neuroendócrina iniciada com a exposição do animal ao estresse, com a liberação de hormônios do estresse, catecolaminas e cortisol na circulação sanguínea (Currier & Evans, 2006). As catecolaminas são liberadas do tecido interno situado no rim da cabeça dos teleósteos e também das terminações dos nervos adrenérgicos. O cortisol é liberado em resposta a vários hormônios hipofisários, mas principalmente de forma potente ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que também estimula a liberação de adrenalina, a liberação do cortisol ocorre a partir do lançamento das catecolaminas, com a ativação do eixo hipotálamo hipófise-interrenal (HPI), que desencadeia a liberação de hormônios esteroides glicocorticóides, que uma vez na circulação sanguínea auxilia na mobilização da glicose armazenada influenciando a recuperação da homeostasia do animal (Koakoski et al., 2012; Koakoski et al., 2014). A ação desses hormônios varia de acordo com a espécie do peixe, características genéticas, duração e intensidade do estímulo e o ambiente a que os animais estão expostos (Currier & Evans, 2006).

A resposta secundária compreende diversos efeitos bioquímicos e fisiológicos associados ao estresse, mediados pelos hormônios descritos acima, que por sua vez irão acionar uma série de alterações metabólicas, que resultam em modificações químicas hematológicas, como alteração na concentração de glicose no plasma (Evans & Claiborne, 2006). O incremento da glicose durante o estresse ocorre devido a aumento da demanda energéticas nos tecidos principalmente, músculo, cérebro e brânquias, com o fígado como principal fonte de glicose (Evans & Claiborne, 2006). Já a resposta terciária corresponde as mudanças no animal em si, em casos de estresse prolongado sem aclimatação ou adaptação do animal podendo ocorrer redução da reprodução, crescimento e desempenho (Evans & Claiborne, 2006).

As diferentes respostas do estresse que são mensuradas e identificadas podem ser utilizadas como padrões de bem-estar animal. Alguns indicadores podem ser metabólitos, como a glicose que é associada a um conjunto de respostas secundárias que auxiliam o animal a se recuperar de um desafio e sobreviver pela mobilização da glicose armazenada (Barton, 2002; Sapolsky et al., 2000; Labarrère et al., 2013).

Metabólitos podem ser mensurados a partir de amostras de sangue em equipamentos portáteis e são úteis para avaliar a resposta aguda dos peixes a estressores (Barton et al., 2002). Os níveis desses metabólitos também são afetados por processos metabólicos não relacionados ao estresse, sendo os resultados da linha de base de difícil interpretação, sendo mais úteis para medidas de respostas agudas a agentes estressores específicos (Sopinka et al., 2017).

Os leucócitos também podem ser indicadores, uma vez que, compõem um grupo de células no sangue que desempenham uma função de defesa imunológica, divididos em cinco tipos na maioria dos vertebrados: basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos (Sopinka et al., 2017) com concentrações no organismo variável, de acordo com a presença e mecanismos de ação dos fatores causadores de estresse (Dhabhar et al., 1996).

Outro indicador é o hematócrito, que pode ser classificado como a porcentagem volumétrica de hemácias no sangue que realizam o transporte de oxigênio, medido pelo número de células compactadas através de centrifugação da amostra de sangue em tubo capilar, a concentração do hematócrito pode variar com a exposição do animal ao estresse, de acordo com o desafio empregado no peixe (Sopinka et al., 2017). Dessa forma, a partir do conhecimento dos principais causadores do estresse e os diversos indicadores das alterações negativas do organismo dos peixes é possível buscar e utilizar alternativas que mitiguem tais alterações como utilização de anestésias e imunoestimulantes durante as atividades de manejo dentro da piscicultura.

1.4 Imunidade em peixes

De forma geral a imunidade em peixes pode ser definida como uma rede complexa, sofisticada, redundante e com multiníveis de mecanismos de defesa sendo influenciada por fatores bióticos e abióticos, e de forma similar aos demais vertebrados os peixes apresentam dois componentes na resposta imune, a resposta inata ou não específica e a específica ou adaptativa (Rohlenová et al., 2011; Whyte, 2007; Zhu et al., 2013).

A principal função do sistema imunológico inato é realizar a interação inicial frente a um desafio ou patógeno impedindo o acesso ao organismo do animal, possibilitando a ação posterior do sistema imune adaptativo (Bernstein et al., 1998). A reação do sistema imune não específico pode ser dividida em duas categorias, sendo elas, a imunidade humoral e a imunidade mediada por células (Levison, 2016).

A imunidade humoral irá agir após a ação inicial do organismo ao patógeno ou componente nocivo, sendo mediada por substâncias solúveis como, sistema complemento, glicoproteínas, principalmente, lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina (Whyte, 2007; Biller-Takahashi & Urbinati, 2014).

A imunidade celular, é contituida por várias células, como os linfócitos trombóticos, monócitos, granulócitos (Neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas, que irão iniciar a resposta inflamatória que interferindo na permanência dos organismos patogênicos intracelulares, através do processo de lise (Secombes, 1996; Levinson, 2016; Whyte 2007).

A atividade do sistema imune inato independe da exposição do animal a patógenos,

componentes nocivos ou desafios, devido a presença de receptores de reconhecimento (PRR) que irão interagir com moléculas que possuam padrões moleculares associados a patógenos (PPMS) que estão ausentes em células eucarióticas, mas presentes em células patogênicas, possibilitando a ativação do sistema imune específico (Whyte, 2007).

A resposta imune específica ocorre pela atividade dos linfócitos B e T que possuem a função de produzir imunoglobulinas, realizam atividade citotóxica e imunomodulação via citocinas (Shoemaker et al., 2001). Os linfócitos B possuem receptores específicos para os antígenos em sua membrana celular, que após a identificação se dividem em plasmócitos, produzindo anticorpos específicos que irão agir nos organismos patogênicos (Secombes, 1996; Levinson, 2016). Enquanto os linfócitos T possuem capacidade de reconhecer os antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de macrófago, promovendo assim sua proliferação (Levinson, 2016).

1.5 Anestesia

A anestesia é um processo que consiste na perda de sensação total ou parcial do corpo com redução das funções nervosas, é um processo geralmente reversível que ocorre geralmente pela ação de um fármaco (Williams & Wilkins Company, 1892). Na piscicultura a anestesia pode ser utilizada para reduzir os efeitos do estresse, reduzir a mortalidade pós manuseio e facilitar o manuseio dos animais nos mais diversos tipos de manejo empregados como: Manipulação, biometrias, aplicação de hormônios na reprodução para espécies reofílicas e no transporte é desejável a sedação dos animais, com perda de reatividade, decréscimo no metabolismo, mas com manutenção do equilíbrio (Barton, 2000; Cooke et al., 2004). A anestesia também é um método efetivo de promover eutanásia em peixes, em procedimentos invasivos é necessário níveis mais profundos de anestesia levando em consideração o bem-estar do animal (Concea, 2013).

A anestesia é um processo que pode ser dividido em etapas, que incluem, sedação, imobilização, inconsciência (narcose), amnésia e analgesia. A sedação é caracterizada pela redução da sensibilidade, já a anestesia geral ocasiona a perda da consciência do animal, amnésia, como também, imobilização e alívio da dor (Zahl et al., 2012). Dessa forma, um mesmo componente ou agente pode levar o animal a sedação ou anestesia de acordo com a concentração utilizada, tempo de exposição e organismo animal. Com relação a concentração, é importante que a sedação não leve o animal ao aprofundamento do estágio anestésico, uma vez que, aumenta o custo da utilização do anestésico e pode causar mortalidade dos peixes (Sena et al., 2016). O processo anestésico possui diferentes estágios (Tabela 1).

211

212 Tabela 1. Comportamento e fases da anestesia.

Estágio da anestesia	Comportamento
Sedação leve	Perda de reação a movimentos visuais e ao toque
Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio
Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio e tombamento ao toque
Anestesia cirúrgica I	Diminuição dos movimentos operculares
Anestesia cirúrgica II	Mínimo movimento opercular, peixe fica estático
Colapso medular	Overdose, exposição excessiva
Recuperação	Recuperação do equilíbrio, natação normal

213 Adaptado de Ross & Ross, (2008).

214

215 O processo de anestesia com seus diferentes estágios irá ocorrer pela utilização de
 216 anestésicos, que induzem inicialmente, sedação leve, com perda de movimento, reação, de
 217 mobilidade, equilíbrio e consciência (Ross & Ross, 2008). No entanto, é possível definir um
 218 anestésico ideal ou seguro como aquele que não cause danos biológicos, sem afetar seu
 219 desempenho zootécnico a longo prazo, reprodução e sobrevivência. Além disso deve possuir
 220 uma rápida indução anestésica (<180 segundos), como também, uma rápida recuperação (<300
 221 segundos) (Becker et al., 2012; Keene et al. 1998; Ross and Ross 2008). Outro fator de grande
 222 relevância é que o anestésico utilizado seja barato, solúvel em água, tenha rápida degradação
 223 após sua ação no animal, evitando a produção de resíduos na carne, no ambiente e pessoas que
 224 trabalham diretamente (Park et al. 2018; Bolasina et al. 2017; Purbosari et al. 2019).

225 Diversos trabalhos já avaliaram o uso de sedativos e anestésicos, com intuito de
 226 encontrar alternativas para mitigar os efeitos do estresse causados pelas intensas práticas de
 227 manejo na aquicultura (Ak et al., 2022; Aydin & Barbas, 2020; Bandeira Junior et al., 2022;
 228 Bianchine et al., 2019; Favero et al., 2019; Nascimento et al., 2020; Yousefi et al., 2018; Zharan
 229 et al., 2021), mostrando o potencial dos mais diversos compostos e agentes como anestésicos,
 230 que irão agir de acordo com a espécie de peixe, concentração do fármaco e organismo animal
 231 (Zahl et al., 2012). Vale ressaltar a temperatura como um dos principais fatores na ação do
 232 anestésico nos peixes, devido a influência na taxa de processos fisiológicos, uma vez que, em
 233 temperaturas mais elevada, a taxa metabólica basal aumenta, com maior demanda de oxigênio
 234 e frequência da respiração (Stehly et al., 1998; Zahl et al., 2012). Dessa forma, a temperatura
 235 pode acelerar a absorção do anestésico e reduzir os tempos depuração dos compostos (Zahl et
 236 al., 2012).

237 Pesquisas envolvendo a avaliação e utilização de potenciais fármacos anestésicos na

piscicultura são importantes, evitando assim, resultados negativos provenientes da falta de conhecimento dos efeitos dos anestésicos e seus limites de uso ideais. Esses produtos são geralmente oferecidos por imersão no meio, injeção ou como suplemento na dieta, contribuindo na melhoria de desempenho produtivo e redução de estresse dos animais (Tavechio et al., 2009; Tavares-Dias, 2009).

Os anestésicos sintéticos comerciais geralmente utilizados para peixes incluem benzocaína, metanossulfonato de tricaína (MS-222), quinaldina, metomidato, etomidato, barbitúricos e propofol (Neiffer & Stamper 2009; Bolasina et al. 2017; Readman et al. 2017; Souza et al. 2019; Uehara et al. 2019). Porém, existem efeitos colaterais indesejáveis pelo uso de anestésicos sintéticos, como comprometimento das funções cardiovasculares e respiratória, incremento dos níveis de lactato, aumento dos níveis de catecolaminas e inibição da síntese de cortisol (Carter et al. 2011; Zahl et al., 2012).

Dessa forma, é positiva a busca por alternativas ao uso dos fármacos sintéticos como agentes anestésicos, como a utilização de produtos e compostos naturais extraídos de plantas, como os óleos essenciais (Souza et al. 2019; Aydin & Barbas 2020).

1.6 Usos dos óleos essenciais na piscicultura

Os óleos essenciais são extraídos de folhas, flores, caule, raízes e sementes proveniente do metabolismo secundário das plantas, constituindo um importante grupo de matérias-primas para comidas, produtos de higiene, perfumaria e indústria farmacêutica (Souza et al., 2019). Esses aditivos são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas e com baixo peso molecular (Morais, 2009), podendo ser classificados como hidrocarbonetos terpenos, simples e terpenos álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos entre outros (Swamy et al., 2016; Souza et al., 2019). A quantidade desses componentes nos óleos essenciais pode variar de 20 a 200 sendo nomeados de acordo com sua concentração, divididos em: Principais constituintes (20 a 95%); constituintes secundários (1 a 20%); Constituintes vestígio (abaixo de 1%) (Sticher, 2015; Souza et al., 2019).

Esses óleos essenciais são uma das alternativas para controle e profilaxia dos agentes patogênicos e estressores, uma vez que possuem menor toxicidade quando comparado aos sintéticos, menor risco de seleção de patógenos resistentes, maior potencial de biodegradação e são de fácil administração (Coimbra et al., 2006). Esses produtos são geralmente oferecidos por imersão no meio, injeção ou como suplemento na dieta, contribuindo na melhoria de desempenho produtivo e redução de estresse dos animais (Tavechio et al., 2009; Tavares-Dias, 2009). Auxiliando em uma resposta mais eficaz do sistema imune não-específico, como também, influenciando positivamente a resposta imune específica de peixes. Sendo assim, são

capazes de aumentar a resistência do indivíduo a enfermidades, como os ocasionados por bactérias potencialmente patogênicas (Bricknell & Dalmo, 2005).

Esse incremento da ação do sistema imune pode ocorrer devido aos imunoestimulantes simularem ou fornecerem moléculas denominadas Pamps “Padrões moleculares associados a patógenos” (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). Essas moléculas contêm padrões moleculares encontrados em muitos patógenos que podem ser reconhecidos pelos receptores semelhantes a Toll (TLRs), presentes na parede celular de diversas células do sistema de defesa inato (Neutrófilos, linfócitos e monócitos). Por sua vez, esses receptores influenciam na ativação dos leucócitos e produção de moléculas como as citocinas que também agem na ativação dos leucócitos (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). Dessa forma, produtos imunoestimulantes promovem o aumento das taxas de fagocitose pelas células do sistema imune (Harikrishnan et al., 2011).

Diversos produtos têm ação comprovada sobre o funcionamento do sistema imunológico dos peixes, agindo como imunocapacitantes, esses produtos podem desempenhar diferentes funções, como sedativos, anestésicos, mitigador de estresse e imunoestimulante para os peixes, até sua utilização como, antiparasitário e antibacteriano, com sua inclusão na dieta e na água do transporte (Tabela 2.) (Almeida et al., 2023; Bakkali et al., 2008; Hai, 2015). Com relação as funções anestésica e sedativa, estas podem ser avaliadas a partir de alterações fisiológicas e ao aumento da atividade metabólica como avaliação da frequência ventilatória e tempos de indução e recuperação ao anestésico (Tabela 2.) (Barman et al., 2013; Becker et al., 2018; Brasil, 2011; Brum et al., 2017; Cunha et al., 2018; Dawood et al., 2018; Hai, 2015; Morais, 2009; Silva & Fernandes Júnior, 2010; Souza et al., 2019).

308 Tabela 2. Efeitos dos óleos essenciais e seus constituintes em diferentes funções e espécies de peixes.

Óleos essenciais e constituintes como sedativos e anestésicos				
Espécie	Óleo essencial/Constituinte	Dose e duração/desafio	Resultados princ.	Referências
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Lippia alba</i>	50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses.	Becker et al., (2018)
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Lippia organoides</i>	25, 50, 100, 200 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses.	Becker et al., (2018)
<i>Rhamdia quelen</i>	Linalol	30, 60 e 180 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) baixas doses.	Heldwein et al., (2014)
<i>Piaractus brachypomus</i>	Eugenol - Mentol	0, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses. Frequência ventilatória ($\downarrow$) – 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ eugenol Glicose no plasma ($\downarrow$) – 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ eugenol	Ferreira et al., (2021)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia alba</i>	25, 50, 100 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses. Frequência ventilatória ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses.	Silva et al., (2019)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia organoides</i>	25, 50, 100 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses. Frequência ventilatória ($\uparrow$) – ($\uparrow$) Doses.	Silva et al., (2019)
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	<i>Ocimum gratissimum</i> <i>Zinziber officinale</i>	100, 150 e 200 mg L^{-1}	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\downarrow$) Doses Hemoglobina, hematócrito ($\uparrow$) <i>Zinziber officinale</i>	da Silva et al., (2020)
<i>Astyanax lacustris</i>	<i>Zingiber ofcinale</i>	0, 75, 150, 300, 450 e 600 $\mu\text{L L}^{-1}$	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\uparrow$) – ($\downarrow$) Doses Frequência ventilatória ($\uparrow$) – ($\uparrow$) Doses. Danos no tecido das brânquias ($\uparrow$) – ($\uparrow$) 300 $\mu\text{L L}^{-1}$.	Silva et al., (2024)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Zingiber ofcinale</i>	0, 50, 100, 200 e 400 mg L^{-1}	Efeito sedativo e anestésico Tempo de Indução anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Tempo de Recuperação anestésica ($\downarrow$) – ($\uparrow$) Doses. Compostos residuais no plasma ($\uparrow$) Doses.	Moreira et al., (2024)

Continuação...				
Óleos essências e constituintes como antiparasitário e antibacteriano				
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Mentha piperita</i>	360, 540, 720, 1440 e 2880 mg L ⁻¹ – <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (24h) – <i>in vitro</i> 0,54 e 2,88 g kg ⁻¹ (30 dias) – <i>in vivo</i>	100% de eliminação 2h – 540 mg L ⁻¹ (↑) Prevalência 84 % 0,54 e 2,88 g kg ⁻¹ Eritrócitos e trombócitos (↑) 0,54 g kg ⁻¹ Taxa de crescimento específico (↑) 0,54 g kg ⁻¹	Costa et al., (2020)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia alba</i>	360, 540, 720, 1440 e 2880 mg L ⁻¹ – <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (24h) – <i>in vitro</i> 1,44 e 2,88 g kg ⁻¹ (30 dias) – <i>in vivo</i>	100% de eliminação 3h – 1440 mg L ⁻¹ (↑) Prevalência 88,46 % 2,88 g kg ⁻¹	Costa et al., (2020)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Zingiber officinale</i>	360, 540, 720, 1440 e 2880 mg L ⁻¹ – <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (24h) – <i>in vitro</i> 1,44 e 2,88 g kg ⁻¹ (30 dias) – <i>in vivo</i>	100% de eliminação 9h – 1440 mg L ⁻¹ (↑) Prevalência 100% Eritrócitos e trombócitos (↑) 1,44 g kg ⁻¹	Costa et al., (2020)
<i>In vitro</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>	0,244; 0,488; 0,977 µg mL ⁻¹ - <i>Edwardsiella</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.	Inibição do crescimento bacteriológico (↑) MIC – (0,244; 0,488; 0,977 µg mL ⁻¹)	Wei et al., (2013)
<i>In vitro</i>	<i>Lippia alba</i> <i>Lippia origanoides</i> <i>Lippia sidoides</i>	Determinação do MIC e MBC – <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Lippia alba</i> MIC e MBC - 5000 µg mL ⁻¹ <i>Lippia origanoides</i> MIC e MBC - 2500 µg mL ⁻¹ <i>Lippia sidoides</i> MIC e MBC - 1250 µg mL ⁻¹	Majolo et al., (2017)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Lippia origanoides</i>	10, 20, 40, 80, 160 e 320 µL L ⁻¹ – monogenoides (Banhos 0 – 9h) – <i>in vitro</i> 20 mg L ⁻¹ – 60 min; 40 mg L ⁻¹ – 30 min	Eficiência positiva (100% de eliminação) (↑) Doses In vivo sem redução da abundância (-) Níveis de proteínas totais, monócitos e neutrófilos (↑) Hematócrito (↓) Danos no tecido das brânquias (↑)	Soares et al., (2017)

309

310

311

312

313

314

315

316

Continuação...				
Óleos essências e constituintes na dieta e água do transporte				
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Aloysia triphylla</i>	0; 0,25; 2,0 mL kg ⁻¹ – <i>Aeromonas hydrophila</i> (30 dias)	Taxa de sobrevivência (↑) Nº de leucócitos T., linfócitos e neutrófilos (↓)	Santos et al., (2017)
<i>Colossoma macropomum</i>	<i>Mentha piperita</i>	0, 0,5, 1,0 e 1,5% kg ⁻¹ – <i>Aeromonas hydrophila</i> (30 dias)	Desempenho zootécnico (-) Hemoglobina (↑) 0,5 e 1,5% Albumina (↓) Colesterol (↑) Pós desafio (↓) Índices hematimétricos	Ribeiro et al., 2016
<i>Oreochromis mossambicus</i>	<i>Citrus limon</i>	0, 0,5, 0,75 e 1,0 % kg ⁻¹ - <i>Edwardsiella tarda</i> (60 dias)	Desempenho zootécnico (-) NBT (↑) Eritrócitos (↑) Lisozima (↑) Colesterol, glicose e triglicerídeos (↓) Proteína total (↑) Taxa de sobrevivência pós desafio (↑)	Baba et al., 2016
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Lippia alba</i>	10 e 20 µL L ⁻¹ – Transporte (4h)	Antioxidante NPSH (↑) TBARS no fígado (↑)	Salbego et al., (2017)
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lippia alba</i>	0, 10 e 20 µL L ⁻¹ Transporte (8h)	Glicose plasmática (↓) Cortisol, lactato e paraoxonase (-) Amônia não-ionizada (↓) Frequência ventilatória (↓)	Hohlenwerger et al., (2017)
<i>Brycon hilarii</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>	10, 20 e 30 µL L ⁻¹ – Transporte (2h)	pH (↓) Hemoglobina, CHCM, HCM (↑) Compostos residuais no plasma, filé e fígado (↑)	Oliveira et al., (2024)
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>	0; 0,5; 1,0 e 1,5 % kg ⁻¹ – <i>Aeromonas hydrophila</i> (45 dias)	Ganho de peso (↑) 1,0% VCM, trombócitos, neutrófilos (↑) 1,0%	da Silva et al., (2021)

317 (↑) Incremento significativa do efeito do óleo essencial; (↓) Redução significativa do efeito do óleo essencial; (-) Sem diferença com a utilização do óleo essencial;

318 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); Concentração inibitória mínima (MIC); Concentração bactericida mínima (MBC); Nitro azul tetrazólio (NBT);

319 Antioxidantes não enzimáticos (NPSH).

320

1.7 Óleo essencial - *Lippia origanoides*

O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae, que compreende cerca de 200 espécies distribuídas na América do Sul, América Central e África de forma ampla (Zoghbi et al., 1998). Diversas espécies desse gênero apresentam atividade biológica e terapêutica que influencia de forma positiva a saúde de diversos organismos, a partir dos seus efeitos anestésicos, antibacterianos, antiparasitários e imunoestimulantes como os óleos essenciais derivados dessas plantas, com isso, o gênero passou a ser utilizado amplamente na aquicultura, como alvo de pesquisas associadas ao bem-estar animal, promotor de crescimento e no setor produtivo (Hashimoto et al., 2016; Majolo et al., 2017), .

No Brasil são encontradas diversas espécies de *Lippia spp.*, com características positivas para utilização na piscicultura, principalmente seus óleos essenciais com ampla utilização em pesquisas, como as espécies *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia origanoides* (Soares & Tavares-Dias, 2013). A *Lippia alba* (erva-cidreira) é um subarbusto aromático nativo do Brasil, seu óleo essencial possui diversos bioquímicos como citral, mirceno e 4-terpineno (Majolo et al., 2017), que apresenta uma série de propriedades biológicas no organismo dos peixes, que incluem atividade analgésica, antimicrobiana, antiparasitária, anestésica e imunoestimulante (Tabela 2.) (Hohlenwerger et al., 2017; Majolo et al., 2017; Salbego et al., 2017). A *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) é uma planta perene nativa da Caatinga, é um tipo de arbusto e seu óleo essencial possui diversos bioquímicos como cimeno e timol (Majolo et al., 2017), que podem ser utilizados principalmente como antibacterianos, devido a atividade e mecanismo de ação do timol (Majolo et al., 2017).

A *Lippia origanoides* (Salva-de-Marajó) (Figura 1.), é uma espécie distribuída principalmente em regiões tropicais, é um arbusto com folhas odoríferas, está distribuída por toda América do Sul mais comumente na região amazônica e nordeste do Brasil (Cavalcanti et al., 2010; Lorenzi & Matos, 2008; Veras et al., 2017). Tem sido utilizada de forma ampla pela medicina popular brasileira e o seu óleo essencial possui diversos bioquímicos como carvacrol, thymol e γ -terpineno (Soares et al., 2017), com potencial de utilização como, anestésico, antiparasitário e antibacteriano (Majolo et al., 2017).

O óleo essencial de *Lippia origanoides* já apresentou ação sedativa, anestésica e imunoestimulante para diferentes espécies de peixes. Como anestésico o óleo essencial de *L. origanoides* foi eficaz em induzir anestesia em juvenis de tambaqui, como também, reduzir da frequência ventilatória em diferentes estágios de anestesia (Silva et al., 2019). Para juvenis de *Rhamdia quelen*, expostos ao mesmo óleo essencial foi observada redução dos tempos de indução anestésica à medida que as concentrações do óleo essencial aumentaram, houve também redução na frequência ventilatória após duas horas de exposição a concentrações de 5

e 10 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Para o *Colossoma macropomum* já foi avaliada a toxicidade do óleo essencial em diferentes concentrações (0, 5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 mg L^{-1}) por 96 horas, não foram observadas alterações hematológicas e bioquímicas que comprometessem a homeostase dos peixes durante o período (Oliveira et al., 2018).

Como imunoestimulante, já foi avaliado o efeito do blend de butirato de sódio e o óleo essencial de *Lippia origanoides* combinado e isolado na sanidade e desempenho zootécnico de juvenis de *Oreochromis niloticus*, após 30 dias de suplementação os juvenis alimentados com o blend apresentaram redução da contagem de bactérias heterotróficas no intestino, aumento no número de vilosidades, redução linfócitos infiltrados no fígado e redução da hemoglobina corpuscular média, além de efeitos positivos na composição da microbiota intestinal (Jesus et al., 2021).

Devido a quantidade de espécies com potencial produtivo na piscicultura e a ampla diversidade de espécies de plantas com diferentes composições e óleos essenciais, é importante a realização pesquisas com avaliação dos efeitos sedativos, anestésicos e imunoestimulante da adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* uma das principais espécies de plantas nativas do Brasil com potencial de uso do seu óleo essencial, nas dietas e na água de transporte do pacu, uma vez que não existe relatos de estudo anteriores desse óleo essencial para o pacu *Piaractus mesopotamicus*.



Figura 1. Espécie *Lippia origanoides*

1.8 Bioacumulação e depleção residual

Em sistemas intensivos os peixes estão mais susceptíveis a situações de estresse que podem ocasionar o surgimento de patógenos, e com isso, pode surgir a necessidade de utilização de fármacos sintéticos, no entanto, esses fármacos podem produzir efeitos indesejados quando absorvidos pelos peixes em um processo conhecido como bioacumulação (Harikrishnan et al., 2011; Yu-Wen, 2009). A bioacumulação na piscicultura está associada a farmacocinética dos compostos presentes na água, que engloba todos os processos relacionados ao movimento dos compostos no organismo, a absorção, distribuição, metabolização e excreção, também conhecidos como processo ADME (Abdel-Rahman; Kauffman, 2004). Essa deposição de compostos nos peixes também pode ocorrer com a utilização de anestésicos que podem afetar negativamente as características organolépticas do pescado, com a análise da depleção residual desses componentes sendo uma medida importante para o consumo seguro (Meinertz et al., 1996; Guenette et al., 2007;).

Esses períodos de absorção e eliminação dos anestésicos podem variar de acordo com os compostos e o tipo de tecido analisado (Zahl et al., 2012). Para a benzocaína e isoeugenol, período de eliminação no plasma é mais lento (Kiessling et al., 2009). Já o MS-222 por ser mais hidrofílico possui rápida depuração e eliminação (Zahl et al., 2012), o eugenol é absorvido e eliminado com facilidade (Guenette et al., 2007). Também foi avaliada a depleção residual dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (70 mg L⁻¹) para o *Piaractus mesopotamicus*, na pesquisa, cerca de 64,31% dos seus componentes majoritários foram distribuídos e eliminados do plasma sanguíneo uma hora após a exposição (Ventura et al., 2019). Em *Rhamdia quelen* exposto por até 30 minutos ao constituinte S-(+)-linalool (153 mg L⁻¹) do óleo essencial de *Lippia alba*, foi evidenciado absorção no plasma e cérebro do constituinte nos dois minutos iniciais da exposição, e redução significativa do constituinte nos tecidos após uma hora da exposição (Bianchini et al., 2019). Esses processos são determinados pela taxa de difusão no epitélio branquial devido ao elevado fluxo sanguíneo, favorecendo ainda mais a troca de moléculas entre a água e o sangue, que é dependente da polaridade, ionização e solubilidade lipídica do composto a ser absorvido (Zahl et al., 2012).

Outro fator determinante na absorção, transporte e eliminação dos compostos no processo de depleção residual é a temperatura da água, pois os peixes são animais pecilotérmicos, ou seja, o funcionamento do metabolismo, respiração, demanda de oxigênio, ativação de enzimas, frequência respiratória, agitação e atividade corporal são dependentes da temperatura do meio que vai influenciar em uma maior ou menor absorção de compostos presentes na água (Zahl et al., 2012).

De forma geral, os compostos presentes na água como fármacos e anestésicos são

distribuídos com mais facilidade para tecidos de maior demanda sanguínea como cérebro, fígado que é o principal responsável pelo processo de metabolização e rins, comparado aos músculos esqueléticos e tecido adiposo (Liang et al., 2012; Xu et al., 2013). Com relação aos efeitos anestésicos dos diferentes composto utilizados na piscicultura, uma vez absorvidos pelas brânquias estes são transportados pelo sangue arterial eferente, que é uma rota curta até o sistema nervoso central (SNC), esta via age como um dos principais responsáveis pelo rápido efeito dos anestésicos (Ross e Ross, 2008).

450. 2- OBJETIVOS

451 2.1 Objetivo geral

452

453 Avaliar os efeitos sedativos, anestésicos, promotores de crescimento, mitigador de
454 estresse, imunoestimulantes e de resistência a estresse do óleo essencial de *Lippia origanoides*
455 em juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

456

457 2.2 Objetivos específicos

458

459 Analisar os efeitos imunoestimulante, mitigador de estresse e na taxa de sobrevivência
460 acumulada após desafio térmico de pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas
461 contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

462 Verificar a modulação da frequência ventilatória, os efeitos sedativos, anestésicos e
463 hematológicos de juvenis de pacus *Piaractus mesopotamicus* sedados com diferentes
464 concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

465 Verificar os efeitos hematológicos, imunológicos e nível residual do óleo essencial de
466 *Lippia origanoides* em pacus *Piaractus mesopotamicus* após o transporte.

3- REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S. M.; KAUFFMAN, R. E. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose-response. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, p. 111–136, 2004.
- ALMEIDA, R. G. S.; ACUNHA, R. M. G.; OLIVEIRA, F. C.; OLIVEIRA, K. K. C.; FERREIRA, A. L.; COSTA, D. C.; CARDOSO, C. A. L.; CAMPOS, C.M. Óleos essenciais e sua aplicabilidade na dieta e anestesia de peixes nativos. Óleos essenciais e sua aplicabilidade na dieta e anestesia de peixes nativos. 1ed.: , 2023, v. , p. 1-613.
- AGOSTINHO, A. A.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; JÚLIO, H.F.Jr.; PAVANELLI, C.S.; AGOSTINHO, C.S. **Fish Assemblages**. In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN (Eds) *The Upper Paraná River floodplain: physical aspects, ecology and conservations*, Leiden, 2004, p. 223-246.
- AK, K.; MINAZ, M.; ER, A.; ASLANKOÇ, R. The using potential of a new natural anesthetic agent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Chamomile oil (*Matricaria chamomilla*). **Aquaculture**, v. 561, p. 738742, 2022.
- AYDIN, B.; & BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, v. 520, p. 734999, 2020.
- BABA, E.; ACAR, U.; ONTAS, C.; KESBİCİ, O. S.; YLMAZ, S. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13–18, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.
- BANDEIRA JUNIOR, G.; BIANCHINI, A. E.; DE FREITAS SOUZA, C.; DESCOVI, S. N.; da SILVA FERNANDES, L.; de LIMA SILVA, L.; CARGNELUTTI, J. F.; BALDISSEROTTO, B. The use of cinnamon essential oils in aquaculture: antibacterial, anesthetic, growth-promoting, and antioxidant effects. **Fishes**, v. 7, n. 3, p. 133, 2022.
- BARMAN, D.; NEN, P.; MANDAL, S.; KUMAR, V. Immunostimulants for Aquaculture Health Management. **Journal of Marine Science Research and Development**, v. 3, n. 3, p. 1-11. 2013.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integr Comp Biol**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BECKER, A. G.; PARODI, T. V.; HELDWEIN, C. G.; ZEPPENFELD, C. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 789-796, 2012.
- BECKER, A. J.; FOGLIARINI, C. D. O.; SOUZA, C. D. F.; BECKER, A. G.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F. D.; BALDISSEROTTO, B. Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: a comparative approach between different essential oils. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, e20170185, 2018.

- BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. **Immunity**. In: EVANS DH (Ed), *The physiology of fishes*. 2nd ed., Boca Raton: CRC Press, 1998, p. 215-242.
- BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; RODRIGUES P.; SOUZA, C. DE F.; SILVA L. de L.; SANTOS, A. C. dos.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Pharmacokinetics of S-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: An anesthetic for aquaculture. *Aquaculture*, v.506, p.302–307, 2019.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 86, n. 3, p. 1483-1495, 2014.
- BOLASINA, S. N.; AZEVEDO, A.; PETRY, A. C. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 56-60, 2017.
- BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50–58, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011, 126p.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish Shellfish Immunol**, v. 19, p. 457-472, 2005.
- CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Rev Fish Biol Fisher**, v. 21, p. 51-59, 2011.
- CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. D. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, 829-832, 2010.
- COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; SOUZA, C. S.; RIBEIRO, F. L. B. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006.
- CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Appl Anim Behav Sci**, v. 86, n. 3–4, p. 205–223, 2004.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. Brasília, 2013. Disponível em: <http://web.fc.unesp.br/Home/Pesquisa/diretrizes-da-pratica-de-eutanasia-do-concea.pdf>>. Acesso em: 10 junho. 2024.
- COOKE, S.; SUSKI, C. D.; OSTRAND, K. G.; TUFTS, B. L.; WAHL, D. H. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p.509- 529, 2004.

- COSTA, C. M. S.; da CRUZ, M. G.; LIMA, T. B. C.; FERREIRA, L. C.; VENTURA, A. S.; BRANDÃO, F. R.; CHAGAS, F. C. M.; MARTINS, M. L.; JERÔNIMO, G. T. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100414, 2020.
- CUNHA, J. A.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens – a review. **J. Appl. Microbiol.** v. 125, p. 328–344, 2018.
- CURRIER & EVANS, **The Physiology of Fishes, Third Edition**. Reino Unido: Taylor & Francis, 2006, 624p.
- da SILVA, L. A.; MARTINS, M. A.; SANTO, F. E.; OLIVEIRA, F. C.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; MARTINS, M. L.; de CAMPOS, C. M. Essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* as anesthetics for the South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture**, v. 528, p. 735595, 2020.
- da SILVA, L. A.; PILARSKI, F.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; FERNANDES, C. E.; LIBANORI, M. C. M.; PEREIRA, S. A.; MARTINS, M. L.; de CAMPOS, C. M. *Ocimum gratissimum* essential oil improved the health, innate immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Semina: Ciênc. Agrár*, v. 42, p. 3855-3868, 2021.
- DAWOOD, M.A.; KOSHIO, S.; ESTEBAN, M.Á. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. **Rev Aquacult**, v. 10, p. 950-974, 2018.
- DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **Journal of immunology**, v. 157, n. 4, p. 38-44, 1996.
- de OLIVEIRA, S. R. N.; de OLIVEIRA, M. A. S.; BRANDAO, F. R.; MAJOLO, C.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, e346, 2018.
- EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J.B. (Eds.), **The Physiology of Fishes**. CRC Press, Boca Raton, 2005, pp. 319-342.
- FAO. 2023. **World Food and Agriculture** – Statistical Yearbook 2023. Rome.
- FAVERO, G. C.; E SILVA, W. D. S.; BOAVENTURA, T. P.; LEME, F. D. O. P.; LUZ, R. K. Eugenol or salt to mitigate stress during the transport of juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a Neotropical carnivorous freshwater catfish. **Aquaculture**, v. 512, p. 734321, 2019.
- FERREIRA, A. L.; BONIFÁCIO, C. T.; SILVA, W. D. S.; TAKATA, R.; FAVERO, G. C.; LUZ, R. K. Anesthesia with eugenol and menthol for *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): Induction and recovery times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. **Aquaculture**, v. 544, p. 737076, 2021.
- GUENETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, n.

1-4, p. 262- 265, 2007.

HAI, N.V. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 446, p. 88-96, 2015.

HASHIMOTO, G. S. O.; NETO, F. M.; RUIZ, M. L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, M. L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

HELDWEIN, C. G.; de L SILVA, L.; GAI, E. Z.; ROMAN, C.; PARODI, T. V.; BÜRGER, M. E.; HEINZMANN, B. M. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, n.6, p. 621-629, 2014.

HERRERA, M.; MANCERA, J. M.; COSTAS, B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: Comparative endocrine and physiological responses. **Front Endocrinol**, v. 10, p. 447, 2019.

HOHLENWERGER, J. C.; BALDISSEROTTO, B.; COUTO, R. D.; HEINZMANN, B. M.; da SILVA, D. T.; CARON, B. O.; SCHMIDT, D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1-4, 2017.

IBGE., 2022. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Produção de aquicultura, <https://sidra.ibge.gov.br/geratabela?name=Tabela%204.xlsx&format=xlsx&medidas=true&query=t/3940/n1/all/n2/all/n3/all/v/allxp/p/2022/c654/all/l/t%2Bp,v,c654>; (Acesso: 13.10.2024).

IBGE., 2023. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Produção de aquicultura, <https://sidra.ibge.gov.br/geratabela?name=Tabela%204.xlsx&format=xlsx&medidas=true&query=t/3940/n1/all/n2/all/n3/all/v/allxp/p/2023/c654/all/l/t%2Bp,v,c654>; (Acesso: 13.10.2024).

ISEKI, K.K.; NEGRÃO, J.A.; CASTRUCCI, A.M.L. Variações sazonais dos níveis plasmáticos dos esteróides sexuais (17 Beta estradiol e testosterona) durante o ciclo reprodutivo de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n.2, p. 151-162, 2008.

JESUS, G. F. A.; OWATARI, M. S.; PEREIRA, S. A.; SILVA, B. C.; SYRACUSE, N. M.; LOPES, G. R.; ADDAM, K.; CARDOSO, L.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M. L. Effects of sodium butyrate and *Lippia origanoides* essential oil blend on growth, intestinal microbiota, histology, and haemato-immunological response of Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 62-69, 2021.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, v. 286, n. 3-4, p. 301-308, 2009.

KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; da ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.

- C.; BARCELLOS, L. J. G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 129–132, 2012.
- KOAKOSKI, G.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, T. A.; da ROSA, J. G. S.; de ABREU, M. S.; GUSSO, D.; MARQUEZE, A.; KREUTZ, L.C.; GIACOMINI, A. C. V.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L. J. G. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p. 85–91, 2014.
- KUBITZA, F; CAMPOS, J. L.; ONO, E. A.; ISTCHUK, P. I. Panorama da piscicultura no Brasil: estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da Aquicultura**, v.22, n.132, p.14-25, 2012.
- LABARRÈRE, C. R.; FARIA, P. M. C. D.; TEIXEIRA, E. D. A.; MELO, M. M. Blood chemistry profile of Surubim hybrid fish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) raised in different stocking densities. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 251–258, 2013.
- LIANG, J.; LI, J.; ZHAO, F.; LIU, P.; CHANG, Z. Pharmacokinetics and tissue behavior of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in turbot *Scophthalmus maximus* at two water temperatures. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, p. 644-653, 2012.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum. 2008, 544 p.
- MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. Essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquac. Res**, v. 48, p. 2380–2387, 2017.
- MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n.1, p. 191-194, 2004.
- MEINERTZ, J. R.; STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. **Aquaculture**, v. 148, n. 1, p. 39-48, 1996.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.
- MOREIRA, A. P.; OLIVEIRA, F. C.; FERREIRA, A. L.; de ALMEIDA, P. R.; COSTA, D. C.; CARDOSO, C. A. L.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; de CAMPOS, C. M. Efficacy of essential oil from ginger (*Zingiber officinale*) for anesthesia and transport sedation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol Biochem**, v. 50, p. 865 – 880, 2024.
- NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J**, v. 50, p. 343-360, 2009.
- OLIVEIRA, F.C.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, A. L.; COSTA, D. C.; CARDOSO, C. A. L.; CHAVES, F. C. M.; CAMPOS, C. M. *Ocimum gratissimum* essential oil in the transport water of *Brycon hilarii*: implications at water quality, blood parameters and residues in tissue and plasma. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e280240, 2024.
- PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy

and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877–884, 2008.

PeixeBR. In: **Anuário PeixeBR da piscicultura 2018**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr-2018/>> Acesso em: 12 de maio 2024.

PeixeBR. In: **Anuário PeixeBR da piscicultura 2023**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr-2018/>> Acesso em: 12 de maio 2024.

PeixeBR. In: **Anuário PeixeBR da piscicultura 2024**. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr-2018/>> Acesso em: 12 de maio 2024.

PINTO, N. D. O. F.; RODRIGUES, T. H. S.; PEREIRA, R. D. C. A.; E SILVA, L. M. A.; CÁCERES, C. A.; de AZEREDO, H. M. C.; CANUTO, K. M. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279-288, 2016.

PURBOSARI, N.; WARSIKI, E.; SYAMSU, K.; SANTOSO, J. Natural versus synthetic anesthetic for transport of live fish: A review. **Aquaculture and Fisheries**, v. 4, p. 129-133, 2019.

READMAN, G. D.; OWEN, S. F.; KNOWLES, T. G.; MURRELL, J. C. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. **Sci Rep**, v. 7, p. 7102, 2017.

RIBEIRO, S. C.; CASTELO, A. S.; SILVA, B. M. P.; CUNHA, A. S.; PROIETTI JÚNIOR, A. A.; OBA-YOSHIOKA, E. T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, n.1, p.99 – 106, 2016.

RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A.; ALVES, A.; ROSA, D.; TORATI, L.; SANTOS, V. Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. **EMBRAPA**, Brasília, DF, 2013.

ROHLENOVÁ, K.; MORAND, S.; HYRŠL, P.; TOLAROVÁ, S.; FLAJŠHANS, M.; ŠIMKOVÁ, A. Are fish immune systems really affected by parasites? An immunoecological study of common carp (*Cyprinus carpio*). **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 120, 2011.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. Oxford, Blackwell Science, 3rd ed., 2008, 222p.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documento 53. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2003.

SALBEGO, J.; TONI, C.; BECKER, A. G.; ZEPPENFELD, C. C.; MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 4, p. 696-702, 2017.

SAMPAIO, F. D.; FREIRE, C. A. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish Fisheries**. v. 17, p. 1055-1072, 2016.

- SANTOS, A. C.; SUTILI, F. J.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A.; BRUSQUE, I. C. M.; BALDISSEROTTO, B. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish Shellfish Immun.** v. 62, p. 213–216, 2017.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev.** v.21, p. 55-89, 2000.
- SCHRECK, C. B.; TORT, L. “**The concept of stress in fish**,” in Biology of Stress in Fish - Fish Physiology, Vol. 35, eds SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Cambridge, MA: Academic Press) 1–34, 2016.
- SECOMBES, C. A.; CHAPPELL, L. H. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, p. 167-177, 1996.
- SENA, A. C.; TEIXEIRA, R. R.; FERREIRA, E. L.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; CARON, B. O.; SCHMIDT, D.; COUTO, R. D.; COPATTI, C.E. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* X *Colossoma macropomum*). **Aquaculture**, v. 465, p. 374-379, 2016.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J Venom Anim Toxins Trop Dis.** v. 16, n. 3, p. 402- 13, 2010.
- SILVA, H. N. P. D.; CARVALHO, B. C. F. D.; MAIA, J. L. D. S.; BECKER, A. G.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F. D. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural**, v. 49, n. 6, p, 2019.
- SILVA, B. A. D. O., FERREIRA, A. L., ACUNHA, R. M. G., ALMEIDA, R. G. D. S., DOS SANTOS, J. G., FERNANDES, C. E., CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; CARDOSO, C. A. L.; de CAMPOS, C. M.; COSTA, D. C. Anesthetic efficiency of essential oil of *Zingiber officinale* for *Astyanax lacustris*: induction time, recovery time, ventilatory frequency, and gill histopathology. **Aquaculture International**, v. 32, p. 3733-3746, 2024.
- SIMON, Y.; LEVAVI-SIVAN, B.; CAHANER, A.; HULATA, G.; ANTLER, A.; ROZENFELD, L.; HALACHMI, I. A behavioural sensor for fish stress. **Aquacultural Engineering**, v. 77, p. 107-111, 2017.
- SHOEMAKER, C. A.; KLESIUS, P. H.; LIM, C. **Immunity and disease resistance in fish.** In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Eds.). Nutrition and Fish Health. Binghamton, NY USA: Haworth Press, p. 149-162, 2001.
- SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F.; COLDEBELLA, A.; REIDEL, A. Proteína e energia na alimentação de pacus criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2336-2341, 2010.
- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

- SOARES, B. V.; CARDOSO, A. C. F.; CAMPOS, R. R.; GONÇALVES, B. B.; SANTOS, G. G.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72-78, 2017.
- SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. Stress indicators in fsh. In Fish Physiology (Vol. 35, p. 405–462). Academic Press, 2017.
- SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; BALDISSEROTTO, B.; HEIZMANN, B. M.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MANCERA, J. M. Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. **Front Physiol**, v. 10, p. 454552, 2019.
- STEHLY, G. R; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **J Vet Pharmacol Therap**, v. 21, p. 121-127, 1998.
- STICHER, O. “Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten,” in Sticker Pharmacognosie Phytopharmazie, eds STICHER, O. HEILMANN J.; Zúndorf, I.; HÄNSEL I. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, p. 663– 740, 2015.
- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHA, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2016, 21 p, 2016.
- TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Embrapa Amapá:Macapá, p.226-247. 2009.
- TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.
- TEIXEIRA, R. R.; de SOUZA, R. C.; SENA, A. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN. B. M.; COPATTI, C.E. Essential Oil of *Aloysia Triphylla* Is Effective In Nile Tilapia Transport. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 44, p. 17-24, 2018.
- UEHARA, S. A.; ANDRADE, D. R.; TAKATA, R.; JÚNIOR, A. G.; VIDAL, M. V. The effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus argenteus*. **Aquaculture**, v. 502, p. 326-331, 2019.
- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. 2013. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**, In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFMS, Santa Maria, 2013, Cap.8, p. 225-246.
- VANDERZWALMEN, M.; EATON, L.; MULLEN, C.; HENRIQUEZ, F.; CAREY, P.; SNELGROVE, D.; SLOMAN, K. A. The use of feed and water additives for live fish transport. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 263-278, 2018.
- VENTURA, A. S., DE CASTRO SILVA, T. S., ZANON, R. B., INOUE, L. A. K. A., & CARDOSO, C. A. L. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. **International Aquatic Research**, v. 11, n.1, p. 1-12, 2019.

- VENTURA, A. S.; ARAÚJO GABRIEL, A. M. D.; GANDRA, J. R.; NOIA, I. Z.; POVH, J. A.; JERÔNIMO, G. T. Thermal dynamics and physiological implications in pacu *Piaractus mesopotamicus* anaesthetised with *Ocimum basilicum* essential oil. **International Aquatic Research**, v. 13, n. 4, p. 261-270, 2021.
- WARREN, L. **Review of medical microbiology and immunology**. USA; McGraw-Hill Education Ed. 14, 2016, 489–578p.
- WEI, L.S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran. J. Microbiol*, v. 5, p. 147–152, 2013.
- WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish—A review of current knowledge. **Fish Shellfish. Immunol**, v. 23, p. 1127–1151, 2007.
- WILLIAMS & WILKINS Company, 1982. Stedman's medical dictionary, 24th edition. Baltimore, Maryland, em Summerfelt RC, Smith LS. Anaesthesia, surgery and related techniques. Em: Schrek CB, Moyle PB. Methods for fish biology, cap8, American Fishery Society, 684, 1990 p.
- XU, L.; WANG, H.; YANG, X.; LU, L. Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters-based dosing guidelines of enrofloxacin in grass carp *Ctenopharyngodon idella* to minimize selection of drug resistance. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 1-10, 2013.
- YOUSEFI, M.; HOSEINIFAR, S. H.; GHELICHPOUR, M.; HOSEINI, S. M. Anesthetic efficacy and biochemical effects of citronellal and linalool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) juveniles. **Aquaculture**, v. 493, p. 107-112, 2018.
- ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology Biochemistry*, v.38, n.1, p.201–218, 2012.
- ZAHARAN, E.; RISHA, E.; RIZK, A. Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. **Aquaculture**, v. 534, p. 736251, 2021.
- ZHU, L.; NIE, L.; ZHU, G.; XIANG, L.; SHAO, J. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, p. 39–62, 2013.

CAPÍTULO 2

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932 **Avaliação da inclusão dietética do óleo essencial de *Lippia origanoides***
933 **como imunoestimulante na taxa de mortalidade de juvenis de pacu**
934 **(*Piaractus mesopotamicus*) pós desafio de estresse térmico.**

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951 **O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para**
952 **publicação no periódico Aquaculture.**

Avaliação da inclusão dietética do óleo essencial de *Lippia origanoides* como imunoestimulante na taxa de mortalidade de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pós desafio de estresse térmico.

Resumo

O pacu é uma das principais espécies de peixe de potencial produtivo no Brasil, porém em sistemas produtivos ficam sujeitos aos efeitos do estresse como os causados por temperatura com possíveis perdas produtivas. Os óleos essenciais auxiliam como uma alternativa para a mitigação dos efeitos do estresse. O objetivo do estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietética do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) nas variáveis de desempenho zootécnico de juvenis de pacu e a taxa de mortalidade após desafio a baixa temperatura da água. Os juvenis (n=208) foram alimentados por 75 dias com dietas contendo diferentes concentrações de OELO (0,0 mL kg⁻¹; 1,0 mL kg⁻¹; 1,5 mL kg⁻¹; 2,0 mL kg⁻¹, com quatro repetições cada) para avaliação dos parâmetros de desempenho. E desafiados com redução da temperatura da água por cinco dias para avaliação da taxa de sobrevivência e presença de ectoparasitas nas brânquias e tegumento dos peixes. Não foram observadas diferenças (p>0,05) para o desempenho zootécnico entre os tratamentos. Após o desafio foram observados diferentes valores absolutos nas taxas de mortalidade entre os tratamentos, sendo eles, controle (87,76 ± 14,35%), LO-1,0 (83,33 ± 25,90%), porém não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) em relação aos tratamentos LO-1,5 (45,83 ± 55,43%) e LO-2,0 (41,30 ± 47,40%), respectivamente. Após o desafio foi evidenciada a presença de monogenea e *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias e tegumento dos juvenis de pacu. O OELO entre 1,0 e 2,0 mL kg⁻¹ não afeta desempenho zootécnico de pacu, possibilitando a recomendação de suplementação dietética na concentração de 2 mL kg⁻¹ na dieta para pacu submetidos a variações bruscas de temperatura com possível efeito imunoestimulante.

Palavras chave: Carvacrol; *Ichthyophthirius multifiliis*; Monogenea; Mortalidade

Abstract

Pacu is one of the main fish species with productive potential in Brazil, but in production systems the fishes are subject to the effects of stress such as those caused by temperature with possible production losses. Essential oils help as an alternative to mitigate the effects of stress. The objective of the study was to verify the effects of dietary supplementation with essential oil of *Lippia origanoides* on the zootechnical performance variables of pacu juveniles and the mortality rate after challenge in low water temperature. The juveniles (n= 208) were fed for 75 days with diets containing different concentrations of OELO (*Lippia origanoides* essential oil) (0.0 mL kg⁻¹; 1.0 mL kg⁻¹; 1.5 mL kg⁻¹; 2.0 mL kg⁻¹, with four repetitions each) to evaluate the performance parameters. The fishes were challenged with a reduction in water temperature for five days to evaluate the survival rate and presence of ectoparasites in the gills and tegument. No differences (p>0.05) were observed for zootechnical performance between treatments. After the challenge, different absolute values in mortality rates were observed between treatments, namely control (87.76 ± 14.35%), LO-1.0 (83.33 ± 25.90%), but no significant differences (p>0.05) were observed in relation to treatments LO-1.5 (45.83 ± 55.43%) and LO-2.0 (41.30 ± 47.40%), respectively. After the challenge, the presence of monogenea and *Ichthyophthirius multifiliis* was also evidenced in the gills and tegument of pacu juveniles. OELO between 1.0 and 2.0 ml kg⁻¹ does not affect the zootechnical performance of pacu, making it possible to recommend dietary supplementation at a concentration of 2 ml kg⁻¹ in the diet for pacu subjected to sudden temperature variations with a possible immunostimulating effect.

Palavras chave: Carvacrol; *Ichthyophthirius multifiliis*; Monogenea; Mortality

1. Introdução

Com o objetivo de manter a expansão da produção aquícola brasileira, que é um dos ramos da produção animal que mais cresceu na última década para atender as demandas das populações, a aquicultura tem se mantido em constante processo de desenvolvimento com o surgimento de novas tecnologias (FAO 2020; 2023), principalmente nos sistemas de produção intensivo. Contudo, os sistemas piscícolas estão muitas vezes associados a certas inadequações como as densidades de estocagem excessivas, a alimentação inadequada, a má formulação das dietas, problemas no transporte dos peixes e no manejo, que podem ocasionar estresse excessivo, nos animais, comprometendo suas defesas imunológicas e com posterior surgimento de enfermidades (Harikrishnan et al. 2011; Tavechio et al. 2009).

Outro fator que deve ser levado em consideração pela influência no surgimento de estresse nos peixes é a temperatura, uma vez que os peixes são ectotérmicos, então, a atividade dos processos metabólicos, fisiológicos, imunológicos e manutenção da homeostase irá variar de acordo com a temperatura da água, com a atividade do organismo mais eficiente quando a temperatura está na faixa de conforto térmico para a espécie de peixe (Rodrigues et al. 2013; Zahl et al. 2012; Lucas & Baras 2011).

Com o intuito de controlar a proliferação de patógenos decorrente do surgimento do estresse são utilizados antibióticos sintéticos (Brum et al. 2017). Esses antibióticos podem elevar os custos de produção, contaminar a carne destinada ao mercado, a água que é liberada para o meio ambiente e, se mal administrados têm alto potencial tóxico e podem provocar o surgimento de patógenos resistentes aos medicamentos pela frequente manipulação (Brum et al. 2017; Harikrishnan et al. 2011).

Tendo em vista os possíveis problemas associados com manejos como o transporte inadequado, surgimento de patógenos e dificuldades no uso de antibióticos, a utilização de aditivos naturais preventivos pode ser uma forma de mitigação e redução do estresse dos procedimentos (Vanderzwalmen et al. 2019). Entre os aditivos utilizados na piscicultura, os óleos essenciais são aditivos extraídos de folhas, flores, caule, raiz e sementes, com aplicações terapêuticas que incluem incrementar a resistência ao estresse, ação imunoestimulante, antioxidantes, redução de mortalidade e efeito anestésico (Brum et al. 2017; Dairiki et al. 2013). Sua ação imunoestimulante, é caracterizada pela modulação do sistema imune, consistindo na estimulação e ativação mais rápida do sistema imune inespecífico animal (Harikrishnan et al. 2011).

Vários óleos de diferentes espécies de plantas podem ser utilizados como imunoestimulantes, como, o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* incluso na dieta da tilápia do Nilo. Após 55 dias de alimentação o óleo proporcionou incremento no crescimento dos

animais, da resposta imune e resistência a infecção por *Streptococcus agalactiae* com aumento da sobrevivência (Brum et al. 2017). De modo similar, o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*), proporcionou o incremento da resposta imune e maior resistência ao *Streptococcus agalactiae* após inclusão na dieta do *Oreochromis niloticus* por 55 dias (Brum et al. 2017).

A *Lippia origanoides* (Salva-de-Marajó), é uma espécie nativa encontrada em países da América do Sul e Central (Lorenzi & Matos 2008). Tem sido utilizada de forma ampla pela medicina popular brasileira e o seu óleo essencial possui diversos bioquímicos como carvacrol, timol e γ -terpineno (Soares et al. 2017). Para peixes óleo essencial de *Lippia origanoides* já apresentou ação sedativa, anestésica e imunoestimulante, como na pesquisa de Silva et al. (2019) que avaliaram o óleo essencial como anestésico para o tambaqui, comprovando a eficácia anestésica, como também, foi eficiente em reduzir a frequência ventilatória em diferentes estágios de anestesia. No *Colossoma macropomum* já foi avaliada a toxicidade do óleo essencial em diferentes concentrações (0, 5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 mg L⁻¹), que não ocasionaram alterações hematológicas e bioquímicas (Oliveira et al., 2018).

Também foram avaliados os efeitos do óleo essencial de *Lippia origanoides* como imunoestimulante, isolado e em combinação com o butirato de sódio sob as variáveis de sanidade e desempenho zootécnico de juvenis de *Oreochromis niloticus* após 30 dias de suplementação os juvenis alimentados com o blend apresentaram redução da contagem de bactérias heterotróficas no intestino, aumento no número de vilosidades, redução linfócitos infiltrados no fígado e redução da hemoglobina corpuscular média (Jesus et al., 2021).

Entre as espécies nativas produzidas nos sistemas de produção intensivo, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa que apresenta extenso potencial para a piscicultura pela sua distribuição geográfica no país, rusticidade, fácil adaptação as condições de cultivo e aceitação no mercado consumidor (Signor et al. 2010). Porém, ainda carece de estudos que melhorem seu sistema de defesa frente aos patógenos que acometem essa espécie.

De acordo com o exposto acima, é de suma importância pesquisas com a adição de óleos essenciais nas dietas do pacu, como o óleo essencial de *Lippia origanoides*, uma das principais espécies de plantas nativas do Brasil, nas dietas dessa espécie, uma vez que não existe relatos de estudo anteriores desse óleo essencial para o pacu *Piaractus mesopotamicus*. Com esse intuito, o objetivo da pesquisa foi avaliar se a suplementação dietética com óleo essencial de *L. origanoides* na dieta de juvenis de pacu pode influenciar, o desempenho zootécnico, apresentar efeito imunoestimulante e reduzir a taxa de mortalidade acumulada dos peixes pós desafio por estresse de variação de temperatura.

2. Metodologia.

Aprovação ética da pesquisa

O experimento foi conduzido no Centro de Excelência em Ciência Animal do Cerrado e Pantanal (CECA), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEMS, sob registro 008/2023.

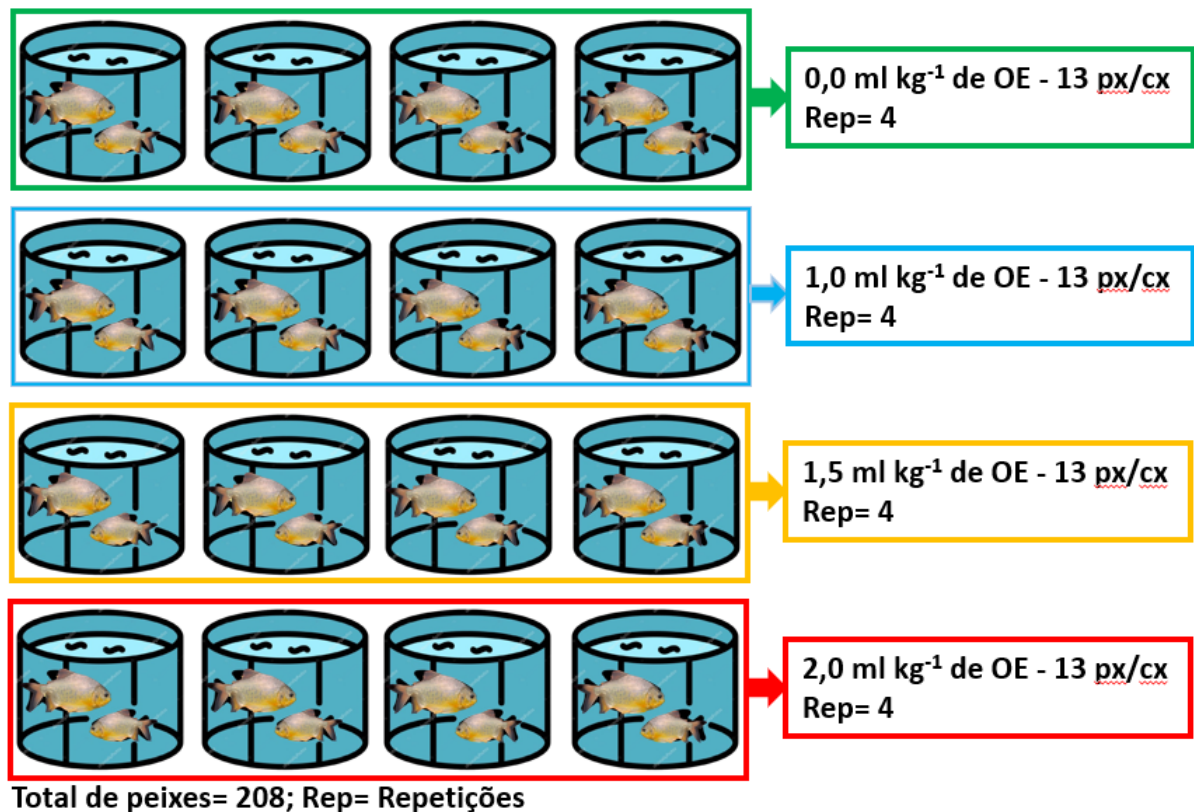
Extração e composição da *Lippia origanoides* e preparação de soluções estoque

O cultivo de *L. origanoides* e a extração de seu óleo essencial foram realizados no setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônica Ocidental, Manuas, Amazônia, Brasil. O óleo essencial foi obtido de folhas frescas de *L. origanoides* em aparelho tipo Clevenger (2 h), também utilizado por Soares et al. (2017). Segundo os mesmos autores, a composição química do EOLO foi determinada por um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. Na pesquisa, os três principais compostos encontrados no EOLO foram carvacrol (49,7%), p-cimeno (13,3%) e timol (9,9%), com menores quantidades de outros componentes

Delineamento e procedimentos experimentais

O delineamento definido foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições: Alimentação sem inclusão do óleo essencial de *Lippia origanoides* na ração (Controle); 1,0 mL kg⁻¹ de óleo essencial (LO-1,0); 1,5 mL kg⁻¹ de óleo essencial (LO-1,5); 2,0 mL kg⁻¹ de óleo essencial (LO – 2,0) e foram utilizados 208 juvenis de pacu com cerca de 20g de peso vivo (13 peixes por tanque), como ilustrado na figura 1. Essas concentrações foram escolhidas com base na literatura (Cagol et al. 2020). Para a execução da pesquisa, foram utilizados tanques de polietileno com volume útil de 400L em local com fotoperíodo controlado (12 horas claro - 12 horas escuro), com fluxo contínuo de água, entrada independente de água para cada tanque, renovação do volume total a cada 24 horas e aeração constante.

1127



1128 Figura 1. Delineamento e procedimento experimental da avaliação do óleo essencial de *Lippia*
 1129 *origanoides* em diferentes concentrações na dieta de juvenis de pacu *P. mesopotamicus*.

1130

1131 O experimento foi desenvolvido utilizando ração comercial destinada a peixes onívoros
 1132 (Acqua Line – Supra juvenil), com granulometria de 2.5 mm (Valores: 42% Proteína bruta -
 1133 mínimo, 8% Extrato etéreo – máximo, 14% Material mineral – máximo, 3% Fibra bruta –
 1134 máximo, 30 g kg⁻¹ Cálcio – mínimo, 10 g kg⁻¹ Fósforo – mínimo, 500 mg/kg Vitamina C –
 1135 mínimo e 128 UI/kg Vitamina E – mínimo) ofertadas duas vezes ao dia com o óleo essencial
 1136 de *Lippia origanoides*. A preparação das dietas suplementadas foi realizada de acordo com
 1137 Dairiki et al. (2013), usando álcool de cereais (CereAlcool®, Brasil) como veículo e diluente
 1138 para incorporação do óleo nas rações. Na ração controle apenas o álcool de cereais foi
 1139 aspergido. As rações foram secas a 25°C por 24 horas, embaladas em sacos plásticos e
 1140 armazenadas a -4°C.

1141 Antes de serem transferidos para os tanques de polietileno, os animais foram mantidos
 1142 em jejum prévio à transferência para pesagem e distribuição nos tratamentos e suas respectivas
 1143 repetições configurando a biometria inicial com finalidade de homogeneizar o peso e tamanho
 1144 dos animais em todas as unidades. Nos procedimentos de biometria os peixes foram
 1145 anestesiados com eugenol 1 ml L⁻¹ no intuito de reduzir o possível estresse ocasionado pelo

1146 manuseio.

1147 Após essa primeira biometria, os peixes passaram a receber os tratamentos
1148 experimentais durante 75 dias nos respectivos horários (08:00 e 16:00) com dietas
1149 correspondendo a 5% da biomassa total por dia. Foram realizadas biometrias a cada quinze dias
1150 com o objetivo de acompanhar o crescimento e desenvolvimento dos peixes.

1151 Ao final do período de alimentação, todos os indivíduos passaram por jejum de 16 horas
1152 para posterior realização da biometria final. Decorrida biometria final os animais retornaram ao
1153 sistema e foi iniciado o processo de desafio térmico. O processo consistiu em 15 dias de
1154 exposição dos animais a temperatura abaixo da faixa de conforto térmico com a queda de
1155 temperatura natural decorrente das mudanças climáticas do local. (Máxima $24,0 \pm 0,01$ °C e
1156 mínima de $12,4 \pm 0,01$ °C), e nos últimos cinco dias desse período de exposição foi avaliado o
1157 desafio térmico (Temperatura do período de cinco dias= $14,42 \pm 1,56$ °C) pela taxa de
1158 mortalidade absoluta, como também verificação da presença de ectoparasitas nas brânquias e
1159 tegumento após o processo de desafio térmico.

1160

1161 **Parâmetros de qualidade de água**

1162 Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados duas vezes ao dia (08:00 e
1163 15:30) da seguinte forma: Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) da água e pH com
1164 auxílio de um multiparâmetro (Hanna HI98194) e amônia com auxílio de um kit
1165 fotocolorímetro portátil (Alfakit).

1166

1167 **Variáveis de desempenho Zootécnico**

1168 Após o período experimental foram avaliados os seguintes parâmetros de desempenho:
1169 Peso médio inicial (PMI); Peso médio final (PMF); Biomassa= N° de peixes*Peso médio final;
1170 Ganho em peso médio (GPM)= peso final - peso inicial (g); ganho em comprimento total
1171 (GCT)= comprimento total final- comprimento total inicial (cm); Conversão alimentar aparente
1172 (CAA)= consumo médio diário de ração por peixe/ganho de peso médio diário; Taxa de
1173 crescimento específico (TCE)= $100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{período}]$ e taxa de
1174 sobrevivência ao final do período de alimentação (SOBD) e ao final do desafio térmico
1175 (SOBT)= $(N. \text{ peixes inicial} * N. \text{ peixes final}) / 100$, respectivamente.

1176

1177 **Acompanhamento da temperatura e taxa de mortalidade acumulada após desafio de** 1178 **estresse térmico**

1179 Para o desafio de estresse térmico foi acompanhada a redução da temperatura da água,
1180 após os 75 dias de alimentação dos peixes com ração contendo diferentes concentrações do óleo

essencial de *Lippia origanoides*. O processo consistiu em 15 dias de exposição dos animais a temperaturas abaixo da faixa de conforto térmico com a queda de temperatura natural decorrente das mudanças climáticas do local. (Máxima $24,0 \pm 0,01$ °C e mínima de $12,4 \pm 0,01$ °C), e nos últimos cinco dias desse período de exposição foi avaliado o desafio térmico (Temperatura do período de cinco dias= $14,42 \pm 1,56$ °C) pela taxa de mortalidade absoluta.

Avaliação e descrição de ectoparasitas após desafio térmico

Após o desafio térmico e análise da taxa de mortalidade acumulada, com os peixes remanescentes, foi realizada a avaliação macroscópica, com observação da superfície corporal, brânquias e opérculos para descrever e avaliar a presença de possíveis ectoparasitos nas brânquias e tegumento. Em cada peixe avaliado (n=29), foram confeccionadas lâminas do raspado de muco da superfície corporal e da brânquia, para observação, em microscopia de luz (Jerônimo et al., 2011).

Análise estatística

Foi utilizado o programa GPower (3.1.9.7) para a determinação do dimensionamento dos tratamentos, repetições e número de peixes por tanque. Para o cálculo foi selecionado: Teste F, ANOVA, significância ($p < 0,05$) e poder de 80%. Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade utilizando o teste de Shapiro Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Barlett. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), sendo confirmada existência de diferença significativas, os mesmos foram submetidos teste de Tukey e quando não adequadas ao teste Tukey foram submetidas a análises de regressão polinomial. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3. Resultados

Parâmetros de qualidade de água

Durante todo o experimento de suplementação dietética (75 dias) a temperatura média foi de $24,03 \pm 2,12$ °C, oxigênio dissolvido $5,47 \pm 0,64$ mg L⁻¹, pH de $6,74 \pm 0,12$ e amônia total de $0,1 \pm 0,03$. Já durante o desafio térmico a temperatura média foi de $14,42 \pm 1,56$ °C, oxigênio dissolvido $7,77 \pm 0,16$ mg·L⁻¹, pH de $6,54 \pm 0,59$ e amônia total de $0,0 \pm 0,00$.

Variáveis de desempenho zootécnico após suplementação

No experimento, o fornecimento das dietas experimentais e o consumo de ração dos peixes foi ininterrupto com exceção dos períodos de jejum que antecederiam as biometrias. Após

os 75 dias de alimentação com as dietas experimentais, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos parâmetros de desempenho zootécnico dos juvenis de pacu (Tabela 2), incluindo a SOBD, que apresentou menor valor no tratamento LO-2,0, porém, sem diferença ($p>0,05$).

Tabela 1. Parâmetros de desempenho zootécnico (Média $\pm$ Desvio padrão) de juvenis de pacus após 75 dias de suplementação com óleo essencial de *Lippia origanoides* via dieta.

Variáveis	Tratamentos			
	Controle	LO-1,0	LO-1,5	LO-2,0
PMI (g)	6,48 $\pm$ 0,06	6,47 $\pm$ 0,08	6,40 $\pm$ 0,07	6,46 $\pm$ 0,10
PMF (g)	26,10 $\pm$ 2,36	25,33 $\pm$ 3,18	27,11 $\pm$ 3,37	25,05 $\pm$ 2,09
Biomassa (g)	318,71 $\pm$ 26,10	303,25 $\pm$ 61,16	331,85 $\pm$ 39,95	286,78 $\pm$ 25,08
GPM (g)	19,61 $\pm$ 2,42	18,86 $\pm$ 3,11	20,71 $\pm$ 3,39	18,59 $\pm$ 2,07
GCT (cm)	3,76 $\pm$ 0,31	3,66 $\pm$ 0,40	3,95 $\pm$ 0,47	3,64 $\pm$ 0,32
CAA	2,27 $\pm$ 0,18	2,30 $\pm$ 0,21	2,25 $\pm$ 0,26	2,42 $\pm$ 0,19
TCE (%)	1,85 $\pm$ 0,13	1,81 $\pm$ 0,16	1,92 $\pm$ 0,17	1,80 $\pm$ 0,11
SOBD (%)	94,23 $\pm$ 7,36	92,31 $\pm$ 15,38	94,23 $\pm$ 3,85	88,46 $\pm$ 9,93

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as variáveis ($P < 0,05$).

PMI= Peso médio inicial, PMF= Peso médio final, Biomassa, GPM= Ganho de peso médio, GCT= Ganho em comprimento total, CAA= Conversão alimentar aparente, TCE= Taxa de crescimento específico, TSOBD = Taxa de sobrevivência do período de alimentação.

Taxa de mortalidade acumulada após desafio de estresse térmico e presença de ectoparasitas

Após o desafio de estresse térmico experimental, foi observada mortalidade dos juvenis de pacus em todos os tratamentos. Os tratamentos com maiores valores de taxa de mortalidade acumulada foram o controle (87,76 $\pm$ 14,35%) e LO-1,0 (83,33 $\pm$ 25,90%), porém não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) em relação aos tratamentos LO-1,5 (45,83 $\pm$ 55,43) e LO-2,0 (41,30 $\pm$ 47,40%), respectivamente. Também foi avaliada a presença de ectoparasitas nas brânquias e tegumento após o processo de desafio térmico

Avaliação e descrição de ectoparasitas após desafio térmico

Foram identificados dois ectoparasitos distintos, sendo eles, o protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* e ectoparasitos da classe monogenea (Figura 2.). Nas brânquias foram observados ectoparasitos em todos os tratamentos (Prevalência – 100%), no tratamento LO-1,5 foi identificado monogenea em (100,0 $\pm$ 0,0%) dos peixes com diferença ($p < 0,05$) em

relação ao tratamento LO-2,0 ($58,33 \pm 8,3\%$), que não diferiram em relação aos demais tratamentos controle e LO-1,0.

Não foram observadas diferenças da presença do *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias entre os tratamentos. No tegumento foram observados ectoparasitos em todos os tratamentos (Prevalência – 100%) ($p > 0,05$), e não foram identificadas diferenças ($p > 0,05$) da presença de monogenea e *Ichthyophthirius multifiliis* entre os tratamentos. E entre os tratamentos avaliados, somente o LO-1,5 apresentou a presença de *Ichthyophthirius multifiliis* e Monogenea nas brânquias e no tegumento.

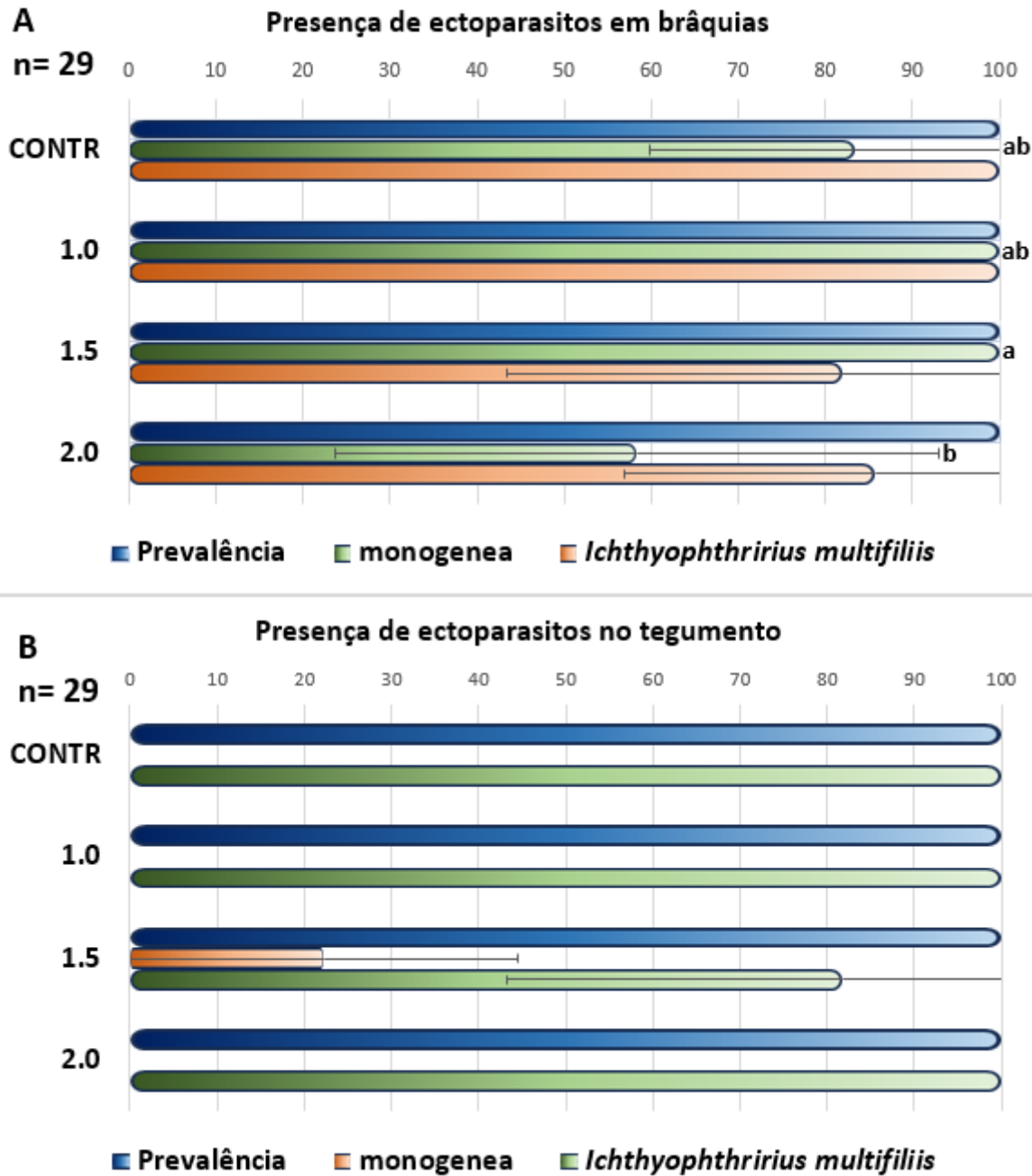


Figura 2. Presença de ectoparasitos em brânquias (A) e tegumento (B) de juvenis de pacus submetidos a desafio térmico após suplementação dietética de óleo essencial de *Lippia*

origanoides. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey - $p < 0,05$).

4. Discussão.

Os óleos essenciais são produtos secundários do metabolismo das plantas, então, certos componentes podem passar por alterações e um mesmo óleo essencial pode apresentar modificações em sua composição (Ribeiro et al. 2016). Esses compostos podem apresentar atividade antimicrobiana, antioxidante, redutora dos efeitos do estresse e efeito anestésico (Brasil et al. 2019; da Cunha et al. 2018). A ação antimicrobiana ocorre geralmente afetando a permeabilidade das células pela vacuolização e lise das células patogênicas (Costa et al. 2005; Zheng et al. 2009). Diversos trabalhos com efeitos positivos da inclusão de diferentes óleos essenciais no desempenho ou modulação do sistema imune já foram reportados, para diferentes espécies de peixes, como, tambaqui (Costa et al. 2020; Queiroz et al. 2022), *Pseudoplatystoma reticulatum* (Almeida et al. 2021), tilápia-do-Nilo (Brum et al. 2017) e *Arapaima gigas* (Corral et al. 2018), demonstrando a importância de pesquisas nas mais diversas espécies de peixes.

No presente estudo a composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou o carvacrol como constituinte principal que corrobora com o estudo de Addam et al. (2018) com maiores concentrações dos compostos carvacrol (49,7%) para o mesmo óleo essencial, os autores observaram que a inclusão do óleo essencial de *Lippia origanoides* incrementou a saúde intestinal e sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo sem comprometer o desempenho zootécnico dos animais, demonstrando o possível efeito imunoestimulante do óleo essencial, sendo possível associar com os resultados do presente estudo, pois não foram observadas alterações no desempenho zootécnico dos juvenis de pacus nos tratamentos com inclusão do óleo essencial, possibilitando sua utilização como possível mitigador de estresse e imunoestimulante. Alves Jesus et al. (2021) também não observaram comprometimento do desempenho zootécnico com a inclusão do butirato de sódio e óleo essencial de *L. origanoides* isolado e em conjunto nas dietas da *Cyprinus carpio*.

A avaliação do efeito imunoestimulante dos fitoterápicos é essencial para determinar os níveis ideais de inclusão dos compostos nas dietas sem ocasionar o comprometimento do desempenho zootécnico e surgimento de fatores antinutricionais (Addam et al., 2018; Brasil et al. 2019; Dawood et al., 2022).

Outra importante variável analisada na pesquisa foi a temperatura durante o desafio de estresse térmico. Durante o período de suplementação térmica a temperatura da água ($24,03 \pm 2,12$ °C) ficou próxima à da faixa de conforto térmico para crescimento e desenvolvimento ($25 - 32$ °C) para espécies de peixe de clima tropical como pacu (Imbiriba et al. 2000). A avaliação

da temperatura é importante, pois os peixes são animais pecilotérmicos, com sua atividade metabólica, fisiológica, imunológica, ingestão de alimento e crescimento dependente da temperatura do ambiente (Rodrigues et al. 2013). Devido a esses fatores, a temperatura da água fora da faixa de conforto térmico pode levar a quadro de estresse, debilitando o sistema imune e também podem ocasionar o surgimento de microrganismos e patógenos com possível mortalidade dos peixes (Harikrishnan et al. 2011; Prötner 2002), como foi evidenciado na pesquisa.

Na pesquisa, foi evidenciada mortalidade dos juvenis de pacus impostos ao desafio em todos os tratamentos, com os tratamentos controle e LO-1,0 com valores absolutos de mortalidade superiores, porém sem diferença estatística ($p>0,05$) em relação a LO-1,5 e LO-2,0, que pode ter ocorrido devido aos efeitos do estresse com redução de atividade metabólica e do sistema imune (Rodrigues et al. 2013), ocasionando o surgimento de ectoparasitos encontrados nas brânquias e tegumento (Figura 3.).

No trabalho foram identificados a presença de *Ichthyophthirius multifiliis* e monogenea que são ectoparasitas que podem causar prejuízos e mortalidade na criação de peixes, com sua suscetibilidade variando de acordo com fatores genéticos, condições ambientais e a população parasitaria (Price & Clayton 1999), além de serem possível vetores de bactérias patogênicas (Liu & Lu 2004). Sendo possível associar a mortalidade dos juvenis de pacus a presença dos ectoparasitos encontrados nas brânquias e tegumento, pois são regiões dos peixes comumente parasitadas em quadros de estresse e situações que comprometem o funcionamento do sistema imune dos peixes (Buchmann et al. 2001; Tavares-Dias et al., 2022).

5. Conclusões

A suplementação dietética do óleo essencial de *Lippia origanoides* não comprometeu o desempenho zootécnico dos pacus, sendo sua utilização segura, possibilitando a recomendação de suplementação dietética na concentração de 2 mL kg⁻¹ na dieta para pacu submetidos a variações bruscas de temperatura com possível efeito imunoestimulante.

Agradecimentos

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil Código 01) pelas bolsas de doutorado e pós-doutorado dos discentes envolvidos na pesquisa. E a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-Brasil nº 71/049.087/2021) pelo apoio para o projeto de pesquisa.

1322

1323 **6. Referências**

- 1324 Addam KGS, Pereira S.A, Jesus GFA, Cardoso L, Syracuse N, Lopes GR, Lehmann NB, Silva
 1325 BC, Sá LS, Chaves FCM (2019) Dietary organic acids blend alone or in combination with an
 1326 essential oil on the survival, growth, gut/liver structure and de hemato-immunological in Nile
 1327 tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquac. Res 50: 2960–2971. <https://doi.org/10.1111/are.14250>
- 1328 Almeida RGS, Martins MA, Oliveira FC, Santo FE, Calves GS, Pilarski F, Chagas EC,
 1329 Fernandes CE, Martins ML, Campos CFM (2021) Dietary supplementation of ginger (*Zingiber*
 1330 *officinale*) essential oil exhibits positive immunomodulatory effects on the neotropical catfish
 1331 *Pseudoplatystoma reticulatum* without negative effects on fish liver histomorphometry. Lat.
 1332 Am. J. Aquat. Res 49: 1–13. <http://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue4-fulltext-2667>
- 1333 Brasil E, Figueredo A, Cardoso L, Santos M, Bertaglia E, Furtado W, Viana J, Carmo I, Chaves
 1334 F, Mouriño J (2019) In vitro and in vivo antiparasitic action of essential oils of *Lippia* spp. in
 1335 Koi Carp (*Cyprinus carpio*) fed supplemented diets. Braz. J. Veter. Pathol 12: 88–100.
 1336 <http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2019/12/v12-n3-2.pdf>
- 1337 Brum A, Pereira AS, Owatari MS, Chagas EC, Chaves FCM, Mourino JLP (2017) Effect of
 1338 dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following
 1339 challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 468: 235–243.
 1340 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>
- 1341 Bly JE, Clem LW (1991) Temperature-mediated processes in teleost immunity: in vitro
 1342 immunosuppression induced by in vivo low temperatures in channel catfish. Veterinary
 1343 Immunology and Immunopathology 28: 365- 377. [https://doi.org/10.1016/0165-](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90127-X)
 1344 [2427\(91\)90127-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90127-X)
- 1345 Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M (2001) Host responses against the fish
 1346 parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Veterinary Parasitology 100: 105-116.
 1347 [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00487-3)
- 1348 Cagol L, Baldisserotto B, Becker AG, Souza CF, Caron BO, Leone FA, Santos LD, Ballester
 1349 ELC (2020) Essential oil of *Lippia alba* in the diet of *Macrobrachium rosenbergii*: Effects on
 1350 antioxidant enzymes and growth parameters. Aquaculture Research 51: 2243-2251.
 1351 <https://doi.org/10.1111/are.14569>
- 1352 Corral ACT, Queiroz MN, AndradE-Porto SM, Morey GAM, Chaves FCM, Fernandes VLA,
 1353 Ono EA, Affonso EG (2018) Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in

- 1354 juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *Piper aduncum*.
 1355 Aquaculture 494: 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>
- 1356 Castagnolli N (Ed.) (2004) Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.
 1357 Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática pp 71-193.
- 1358 Costa JGM, Rodrigues FFG, Silva EC, Mota MR, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG
 1359 (2005) Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e
 1360 *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. Rev Bras Farmacog 15: 304-9.
 1361 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400008>
- 1362 Costa CMS, Cruz MG, Lima TBC, Ferreira LC, Ventura AS, Brandão FR, Chagas EC, Chaves
 1363 FCM, Martins ML, Jeronimo GT (2020) Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*,
 1364 *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus*
 1365 *buttnerae* in *Colossoma macropomum*. Aquacul. Rep 18: 1–8.
 1366 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>
- 1367 da Cunha JA, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2018) The effects of essential oils and their
 1368 major compounds on fish bacterial pathogens-a review. Journal of Applied Microbiology 125:
 1369 328–344. <https://doi.org/10.1111/jam.13911>
- 1370 Dairiki JK, Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Oliveira MR, Moraes IS (2013) Procedimento
 1371 para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Circular Técnica 42, Embrapa
 1372 Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, pp 8.
- 1373 Dawood MA, El Basuini MF, Yilmaz S, Abdel-Latif HM, Alagawany M, Kari ZA, Razab
 1374 MKAA, Hamid NKA, Moonmanee T, Van Doan H (2022) Exploring the roles of dietary herbal
 1375 essential oils in aquaculture: A review. Animals 12: 823. <https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- 1376 Donaldson MR, Cooke SJ, Patterson DA, Macdonald JS (2008) Cold shock and fish. Journal
 1377 of Fish Biology 73: 1491-1530. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x>
- 1378 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. The State of World
 1379 Fisheries and Aquaculture 2020 – Sustainability in action. FAO, Rome.
- 1380 FAO. 2023. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2023. Rome.
- 1381 Falcon DR, Barros MM, Pezzato LE, Vicente W, Solarte N, Guimarães IG (2008) Leucograma
 1382 da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo
 1383 submetidos a estresse por baixa temperatura. Ciência Animal Brasileira 9: 543-551.
 1384 <https://doi.org/10.5216/cab.v9i3.519>

- 1385 Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2011) Impact of plant products on innate and
 1386 adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317: 1-15.
 1387 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
- 1388 Imbiriba EP, Lourenço Júnior JB, Moura Carvalho LOD (2000) Parâmetros ambientais e
 1389 qualidade de água na piscicultura. *EMBRAPA* 8: 1-4.
- 1390 Jerônimo GT, Franceschini L, Zago AC, Silva RJ da, Padua SB de, Ventura AS, Ishikawa MM,
 1391 Tavares-Dias M, Martins ML (2015) Parasitos de peixes Characiformes e seus híbridos
 1392 cultivados no Brasil. In: Tavares-Dias M, Mariano WS dos (Org.) (2015) *Aquicultura no Brasil:*
 1393 *novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores 1, cap. 15, pp 283-304.
- 1394 Jesus GF, Owatari MS, Pereira SA, Silva BC, Syracuse NM, Lopes GR, Addam K, Cardoso L,
 1395 Mouriño JL, Martins ML (2021) Effects of sodium butyrate and *Lippia origanoides* essential
 1396 oil blend on growth, intestinal microbiota, histology, and haemato-immunological response of
 1397 Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol* 117: 62–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.008>
- 1398 Junior ACF, Pezzato LE, Guimarães IG, Teixeira CP, Koch JFA, Barros MM (2010) Resposta
 1399 hemática de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a
 1400 estímulo por baixa temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 1619-1625.
 1401 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800001>
- 1402 Liu YJ, Lu CP (2004) Role of *Ichthyophthirius multifiliis* in the Infection of *Aeromonas*
 1403 *hydrophila*. *Journal of Veterinary Medicine* 51: 222–224. [https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00756.x)
 1404 [0450.2004.00756.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00756.x)
- 1405 Lucas MC, Baras E (2001) *Migration of freshwater fishes*. Malden: Blackwell Science.
- 1406 Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C, Diniz MS (2013) Influence of temperature in
 1407 thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and*
 1408 *Physiology (A)* 166: 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>
- 1409 Oba TE, Mariano SW, Romagueira L (2009) Estresse em peixes cultivados: agravantes e
 1410 atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias M (Org.) *Manejo e Sanidade de Peixes em*
 1411 *Cultivo*. Embrapa Amapá:Macapá, pp 226-247.
- 1412 Oliveira SRN, de Oliveira MAS, Brandao FR, Majolo C, Chaves FCM, Chagas EC (2018)
 1413 Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its
 1414 effect against *Aeromonas hydrophila*. *Boletim do Instituto de Pesca* 44: 1-7.
 1415 <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.346>

- 1416 Oliveira MIB, Brandão FR, Tavares-Dias M, Barbosa BCN, Rocha MJS, Matos LV, Souza
 1417 DCM, Majolo C, Oliveira MR, Chaves FCM (2024) Essential oils of *Ocimum gratissimum*,
 1418 *Lippia grata* and *Lippia origanoides* are effective in the control of the acanthocephalan
 1419 *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. Aquaculture 578: 740043.
 1420 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740043>
- 1421 Price DJ, Clayton GM (1999) Interações genótipo-ambiente na susceptibilidade da carpa
 1422 comum, *Cyprinus carpio*, as infecções por *Ichthyophthirius multifiliis*. Aquaculture 173: 149-
 1423 160. <https://doi.org/10.26605/medvet-v12n4-2455>
- 1424 Prötner HO (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent
 1425 biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative
 1426 Biochemistry and Physiology (A) 132: 739-761. [https://doi.org/10.1016/S1095-](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4)
 1427 6433(02)00045-4
- 1428 Queiroz MN, Torres ZES, Pohlit AM, Ono EA, Affonso EG (2022) Therapeutic potential of
 1429 *Piper aduncum* leaf extract in the control of monogeneans in tambaqui (*Colossoma*
 1430 *macropomum*). Aquaculture 552: 738024. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738024>
- 1431 Ribeiro AS, Batista ES, Dairiki JK, Chaves FCM, Inoue LAKA (2016) Anesthetic proprieties
 1432 of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. Acta Sci. Anim. Sci 38: 1–7.
 1433 <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i1.28787>
- 1434 Rodrigues APO, Lima AF, Alves AL, Rosa DK, Torati LS, Santos VRV (Ed.) (2013)
 1435 Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento. Brasília, DF: Embrapa.
- 1436 Signor AA, Boscolo WR, Feiden A (2010) Proteína e energia na alimentação de pacus criados
 1437 em tanques-rede. Revista Brasileira de Zootecnia 39: 2336-2341.
 1438 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100004>
- 1439 Silva HNP, Carvalho BCF, Maia JLS, Becker AG, Baldisserotto B, Heinzmann BM, Mourão
 1440 RHV, da Silva LVF (2019) Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia*
 1441 *origanoides* in Tambaqui juveniles. Cienc Rural 49:1-6. [http://dx.doi.org/10.1590/0103-](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20181059)
 1442 8478cr20181059
- 1443 Soares BV, Cardoso ACF, Campos RR, Gonçalves BB, Santos GG, Chaves FCM, Chagas E C,
 1444 Tavares-Dias M (2017) Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil
 1445 of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma*
 1446 *macropomum*. Aquaculture 469: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- 1447 Tavares-Dias M, Luz JGR, FLORES GONZALES APP (2022) Óleos essenciais como

- 1448 alternativa no controle e tratamento contra monogenéticos das brânquias de tambaqui.
1449 Comunicado técnico 162, Embrapa, Macapá, AP.
- 1450 Tavechio WL, Guidelli G, Portz L (2009) Alternativas para a prevenção e o controle de
1451 patógenos em piscicultura. Boletim do Instituto de Pesca 35: 335 - 341.
- 1452 Urbinati EC, Carneiro PCF (2004) Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In:
1453 Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N (Ed.) (224) Tópicos especiais em
1454 piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e
1455 Biologia Aquática, pp 71-193.
- 1456 Vanderzwalmen M, Eaton L, Mullen C, Henriquez F, Carey P, Snellgrove D, Sloman KA
1457 (2018) The use of feed and water additives for live fish transport. Reviews in Aquaculture 11:
1458 263-278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>
- 1459 Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang KY (2009) Evaluation of oregano
1460 essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against
1461 *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 292: 214 – 218.
1462 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>

1463

1464

1465

1466

1467

1468

1469

1470

1471

1472

1473

1474

1475

1476

1477

1478

1479

1480

1481

1482

1483

1484

1485

1486

1487

CAPÍTULO 3

1488

1489

1490

1491

1492

1493

1494

1495

1496

1497

1498

1499

1500

1501

1502 **Óleo essencial de *Lippia origanoides* como anestésico para *Piaractus***

1503 ***mesopotamicus*: implicações nos tempos de indução e recuperação,**

1504 **frequência ventilatória e respostas sanguíneas após manejo biométrico**

1505

1506

1507

1508

1509

1510

1511

1512

1513

1514

1515

1516

1517

1518

1519

1520

1521 **O artigo a seguir foi redigido de acordo com as exigências e submetido para publicação**
1522 **no periódico Brazilian Journal of Biology.**

**Óleo essencial de *Lippia origanoides* como anestésico para *Piaractus mesopotamicus*:
implicações nos tempos de indução e recuperação, frequência ventilatória e respostas
sanguíneas após manejo biométrico**

**Essential oil of *Lippia origanoides* as an anesthetic for *Piaractus mesopotamicus*:
implications for induction and recovery times, ventilatory frequency and blood
responses after biometric management**

Resumo

Este estudo avaliou o uso do óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO) como anestésico para juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Foram realizados dois ensaios. No primeiro foram determinados os tempos de indução e recuperação anestésica e a frequência ventilatória (FV) para peixes ($n = 48$; $29,94 \pm 6,69$ g) expostos a diferentes concentrações de EOLO [0 (controle – $4.000 \mu\text{L álcool L}^{-1}$), 25, 50, 100, 200 e $400 \mu\text{L L}^{-1}$]. A partir desses resultados foram determinadas as concentrações de EOLO do ensaio 2 ($n = 36$; $29,25 \pm 5,90$ g), na qual avaliou os efeitos de 0 (controle - $2.000 \mu\text{L álcool L}^{-1}$), 50 (fora da indução recomendada e tempos de recuperação) e $200 \mu\text{L L}^{-1}$ (dentro dos tempos de indução e recuperação recomendados), sob os parâmetros imunohematológicos e bioquímicos em diferentes tempos de coleta (1 hora e 24 horas pós-indução). A sobrevivência dos peixes foi de 100% em ambos os experimentos. A concentração de EOLO de $25 \mu\text{L L}^{-1}$ não foi capaz de induzir anestesia profunda nos animais, enquanto a concentração de $200 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentou tempos de indução e recuperação dentro da faixa indicada para peixes e foi eficiente na redução da FV durante a indução. Não foram observadas diferenças nos parâmetros imunohematológicos e bioquímicos entre as concentrações, mas foram observadas diferenças nas comparações entre os tempos de coleta. Porém, a maioria das variáveis sanguíneas retornaram a níveis considerados normais para a espécie 24 horas após a anestesia. Portanto, uma concentração EOLO de $200 \mu\text{L L}^{-1}$ pode ser considerada segura para uso antes do manejo biométrico de *P. mesopotamicus*.

Palavras-chave: Anestésico fitoterápico, Bem-estar, Carvacrol, Hematologia, Pacu

Abstract

This study evaluated the use of the essential oil of *Lippia origanoides* (EOLO) as an anesthetic for juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Two trials were performed. In trial 1, anesthetic induction and recovery times and ventilatory frequency (VF) were determined for fish (n= 48; 29.94 ± 6.69 g) exposed to different EOLO concentrations [0 (control - 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$), 25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{L L}^{-1}$]. From the responses obtained, the EOLO concentrations of trial 2 (n= 36; 29.25 ± 5.90 g) were determined, which evaluated the effects of 0 (control - 2000 $\mu\text{L alcohol L}^{-1}$), 50 (outside recommended induction and recovery times) and 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ (within recommended induction and recovery times) by analyzing immunohematological and biochemical parameters at different collection times (1 h and 24 h post-induction). Fish survival was 100% in both experiments. The EOLO concentration of 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ was not able to induce deep anesthesia in the animals, while the concentration of 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ showed induction and recovery times within the range indicated for fish and was efficient at reducing VF during induction. No differences were observed in immunohematological and biochemical parameters among concentrations, but differences were observed in comparisons between collection times. Nonetheless, blood variables returned to levels considered normal for the species in approximately 24 hours. Therefore, an EOLO concentration of 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ can be considered safe for use prior to biometric management of *P. mesopotamicus*.

Keywords: Well-being, Carvacrol, Phytotherapeutic anesthetic, Hematology, Pacu

1. Introdução

Na aquicultura, a utilização de sedativos e anestésicos é uma prática de suma importância para favorecer a homeostase e o bem-estar dos peixes durante e após as ações de manipulação, reprodução, biometria e transporte minimizando os efeitos do estresse que podem ocasionar no comprometimento da saúde e sobrevivência dos peixes (Boyd et al. 2008; Ferreira e Barcellos 2008; Ross e Ross 2008; Teixeira et al. 2017; Costa et al. 2019; Hoseini et al. 2019; Boaventura et al. 2021; Ferreira et al. 2021b; Pellegrin et al. 2023). Também é importante a identificação e comportamento dos peixes em situações de estresse, que pode ser realizado a partir de indicadores, como o perfil e parâmetros hematológicos, pois, essas alterações ocorrem frequentemente em situações de estresse, então, esses indicadores são ferramentas importantes para avaliação dos processos de sedação e anestesia (Morgan e Iwana, 1997; Tavares-Dias et al. 2008).

Na piscicultura podem ser utilizado anestésicos sintéticos e naturais (Purbosari et al. 2019), os anestésicos sintéticos disponíveis no mercado incluem benzocaína, metanossulfonato de tricaína (MS-222), quinaldina, metomidato, etomidato, barbitúricos e propofol (Neiffer and Stamper 2009; Bolasina et al. 2017; Readman et al. 2017; Souza et al. 2019; Uehara et al. 2019). No entanto, efeitos colaterais indesejáveis com o uso dos anestésicos sintéticos já foram observados em peixes, como depressão da função cardiovascular e respiratória, elevação dos níveis de lactato, aumento dos níveis de catecolaminas e inibição da síntese de cortisol (Carter et al. 2011; Zahl et al. 2012).

Neste sentido, os óleos essenciais de espécies vegetais da família Verbenaceae têm sido investigados quanto à sua atividade biológica. Entre essas espécies, *Lippia origanoides* é uma planta aromática encontrada em toda a América do Sul (Stashenko et al. 2010). Seu óleo essencial possui três quimiotipos, caracterizados de acordo com seus componentes principais: α - e β -felandrenos, *p*-cimeno, e limoneno distinguem o quimiotipo A; carvacrol e timol foram os componentes majoritários dos quimiotipos B e C (Stashenko et al. 2010). Na aquicultura, seu uso demonstrou efeito antimicrobiano (Oliveira et al. 2024), antioxidante (Santos-Filho et al. 2023) e anestésico (Becker et al. 2018; Silva et al. 2019). A eficácia anestésica do óleo essencial de *L. origanoides* do quimiotipo carvacrol como principal constituinte só foi demonstrado no *Rhamdia quelen* (Becker et al. 2018) e *Colossoma macropomum* (Silva et al. 2019).

O carvacrol é um monoterpene fenólico que pode desempenhar diversas funções no organismo, entre elas, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (da Rosa Coelho et al. 2021; Santos-Filho et al. 2023), que aliado a seu efeito sedativo e anestésico (Becker et al. 2018; Silva et al. 2019) pode representar uma alternativa viável de utilização na piscicultura, e também já

foi aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA, 2017) como um componente sem efeitos tóxicos em humanos. Sua atividade antioxidante pode influenciar positivamente na qualidade da carne dos peixes, e no tempo de estocagem (Ebbohimen et al. 2023).

A concentração ideal de um determinado anestésico está associada a espécie e tamanho do peixe (Ross and Ross 2008; Readman et al. 2017; Ferreira et al. 2020). A eficiência anestésica está relacionada a indução rápida da anestesia (< 180 s) e recuperação rápida (< 300 s) (Keene et al. 1998; Ross and Ross 2008). Além disso, um bom anestésico é aquele que seja prático de usar, barato, solúvel em água e que não deixe resíduos nos colaboradores, peixes ou no meio ambiente (Park et al. 2018; Bolasina et al. 2017; Purbosari et al. 2019). Na aquicultura, muitos pesquisadores têm investigado, essas características, em produtos extraídos de plantas aromáticas, como por exemplo, os óleos essenciais (Souza et al. 2019; Aydin and Barbas 2020).

O pacu *Piaractus mesopotamicus* é uma espécie nativa encontrada nas bacias dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai (Valladão et al. 2018). O *P. mesopotamicus* apresenta importância para a aquicultura, pois apresenta rápido desempenho de crescimento, rusticidade aos diversos tipos de manejos, fácil adaptação à alimentação artificial (ração) e boa aceitação pelo mercado consumidor (Urbinati and Gonçalves 2005).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial anestésico do óleo essencial de *L. origanoides* (EOLO) em juvenis de *P. mesopotamicus*, sob os tempos de indução e recuperação, frequência ventilatória e respostas sanguíneas, após manejo de biometria.

2. Material e Métodos

Aprovação do comitê de ética

O experimento foi conduzido no Centro de Excelência em Ciência Animal do Cerrado e Pantanal (CECA), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de registro (008/2023), da UEMS.

Extração e composição do EOLO e preparo das soluções estoques

O cultivo de *L. origanoides* e a extração do óleo essencial foram realizados no setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônica Ocidental, Manaus, Amazônia, Brasil. O óleo essencial foi obtido através das folhas frescas de *L. origanoides* usando um aparelho do tipo Clevenger (2 h), conforme também utilizado por Soares et al. (2017). Segundo os mesmos autores, a composição química do EOLO foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa. Os três principais compostos do EOLO foram carvacrol (49.7%),

p-cimeno (13.3%) e timol (9.9%), com menores quantidades de outros componentes (Fig. 1).

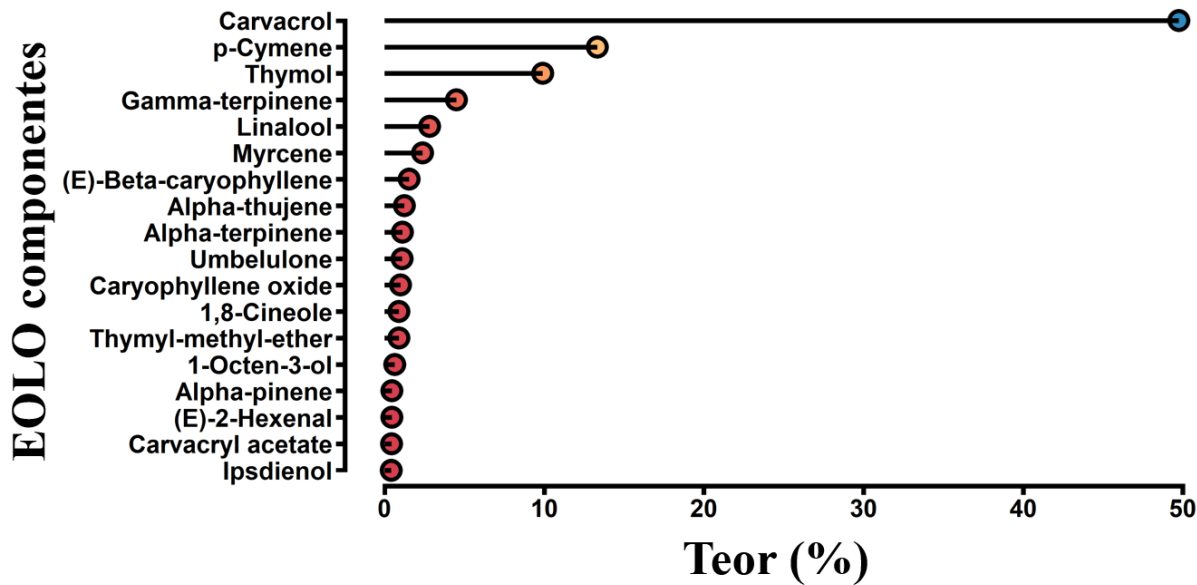


Figura 1. Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO) determinada através de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).

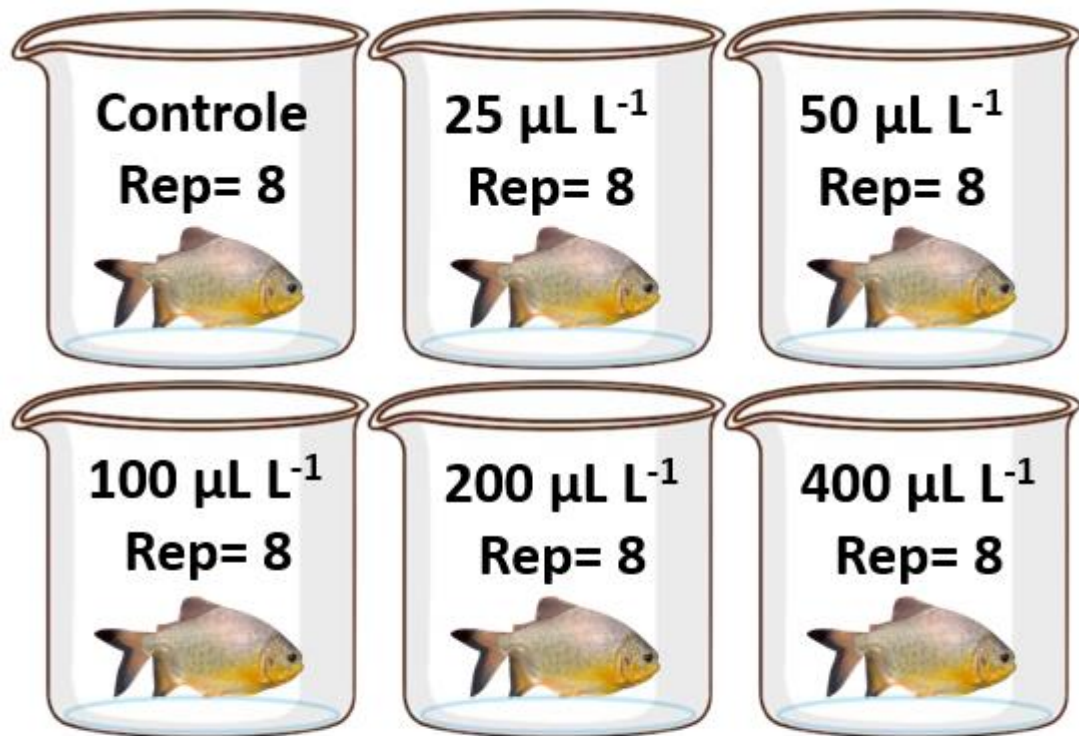
Previamente aos experimentos, todas as concentrações de EOLO foram diluídas em álcool etílico 1:10 (V:V), a fim de garantir a sua completa dissolução na água. O volume de álcool etílico equivalente à maior concentração do EOLO, em cada experimento, foi utilizado para o grupo controle (0 $\mu\text{L L}^{-1}$), conforme também adotado por Ferreira et al. (2021a).

Animais e aclimação

Os peixes foram oriundos da Piscicultura da UEMS, aclimatados e distribuídos em 12 tanques de polietileno (400 litros de volume útil) em sistema de circulação de água contínua e aeração constante, durante duas semanas. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00) até a aparente saciedade, com dieta comercial (Supra, ACQUALine) de 2,5 mm diâmetro e 42% de proteína bruta. Previamente aos experimentos, todos os animais foram submetidos ao jejum de 24 h para esvaziamento do trato gastrointestinal. Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados diariamente, cerca de 30 minutos antes do fornecimento da ração. A temperatura da água esteve próxima de $23,85 \pm 1,78\text{ }^{\circ}\text{C}$, o pH entre $6,87 \pm 0,57$, o oxigênio dissolvido de $5,90 \pm 0,57\text{ mg L}^{-1}$ (mensurados com uma sonda multiparâmetro - Hanna, HI98194), e amônia total de $0,02 \pm 0,0003\text{ mg L}^{-1}$ (determinada através do teste colorimétrico - Labcon).

1680 *Procedimentos experimentais - Efeito anestésico de EOLO em juvenis de Piaractus*
 1681 *mesopotamicus*

1682 Foram utilizados 48 juvenis de *P. mesopotamicus* ($29,94 \pm 6,69$ g e $11,52 \pm 0,91$ cm),
 1683 distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em seis diferentes concentrações de
 1684 EOLO, a saber: 0 (Controle – $4000 \mu\text{L L}^{-1}$ de álcool etílico), 25, 50, 100, 200 e $400 \mu\text{L L}^{-1}$, de
 1685 acordo com Silva et al. (2019). Foram utilizados ($n =$ oito peixes) para cada concentração, e
 1686 cada animal foi utilizado apenas uma vez e foi considerado uma repetição, como ilustrado na
 1687 figura 2.



Rep= Nº de peixes/repetições

Total= 48 peixes ($29,94 \pm 6,69$ g; $11,52 \pm 0,91$ cm)

Controle= $4000 \mu\text{L L}^{-1}$ de álcool etílico

1688 Figura 2. Delineamento e procedimento experimental da avaliação do óleo essencial de *Lippia*
 1689 *origanoides* como anestésico para juvenis de pacu *P. mesopotamicus*.

1690

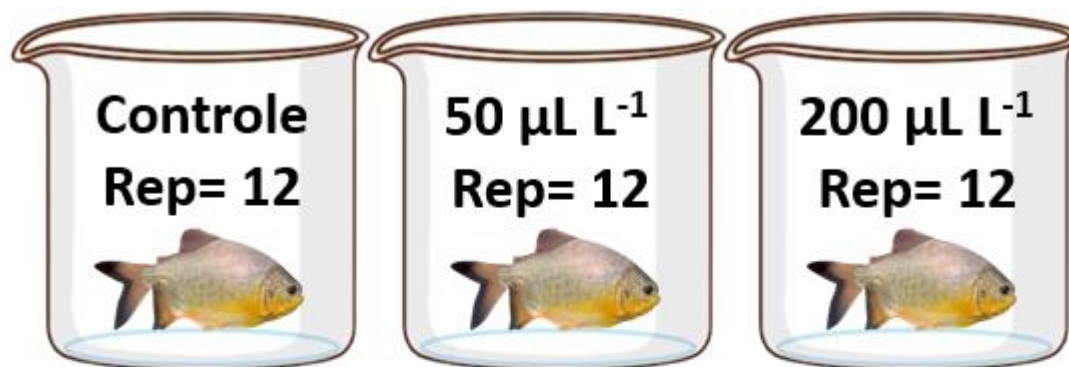
1691 Para avaliação do efeito anestésico, os peixes foram expostos as concentrações de
 1692 EOLO pré-estabelecidas em béqueres de 1 L (água do próprio sistema de cultivo, com aeração
 1693 suplementar). O tempo de indução da anestesia foi cronometrado com auxílio de um cronômetro
 1694 digital (Vollo VI510), desde o primeiro contato do peixe com a solução anestésica até atingir o
 1695 estágio de anestesia profunda, que se caracterizou pela perda de equilíbrio e ausência de
 1696 natação, o que implica movimentos operculares lentos e irregulares e ausências de reflexos

(Small 2003; Ross e Ross 2008; Silva et al. 2023). Durante a mensuração do tempo de indução foi realizada a contagem dos batimentos operculares dos animais (frequência ventilatória – VF), conforme descrito por Alvarenga e Volpato (1995). Após a anestesia profunda, foi realizado a biometria (mensuração do peso e comprimento) dos animais através de uma balança semi-analítica (Shimadzu – BL320H) e uma régua. Esse procedimento durou cerca de 45 s. Em seguida, os animais foram transferidos para béqueres de 1 L (com água limpa, sem anestésico) e foi cronometrado o tempo de recuperação e contado a VF. Os peixes foram considerados recuperados quando atingiram o estágio de recuperação total, que basicamente se caracterizou pelo equilíbrio, natação normal e responsividade aos estímulos visuais (Small 2003; Ross and Ross 2008; Silva et al. 2023).

Ao final do experimento, os peixes de cada concentração de EOLO foram realocados em suas unidades experimentais originais para observação do retorno a alimentação e sobrevivência, durante sete dias.

Com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio anestésico, foi elaborada uma nova etapa experimental para avaliação dos efeitos do EOLO sob as variáveis hematológicas dos peixes, com a mesma espécie (*P. mesopotamicus*), porém, utilizando novos indivíduos, ou seja, não foram utilizados nenhum dos indivíduos do ensaio anterior. No novo ensaio foram avaliadas três concentrações de EOLO, sendo elas, 0 (Controle – somente álcool etílico), 50 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO. A determinação das concentrações nessa etapa experimental, ocorreu de acordo com Keene et al. (1998) e Ross e Ross (2008) que enfatizam que a concentração ideal de um determinado anestésico está relacionada a uma rápida indução anestésica (em até 180 s) e recuperação (em até 300 s). A partir deste pressuposto, as concentrações usadas neste novo ensaio, foram escolhidas por estarem abaixo dos tempos limites considerados ideais para anestesia de peixes (50 $\mu\text{L L}^{-1}$) e outra por estar dentro da faixa de tempo considerada ideal para anestesia de peixes (200 $\mu\text{L L}^{-1}$) e um grupo controle (2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de álcool).

Foram utilizados 36 juvenis de *P. mesopotamicus* ($n = 12$ peixes para cada concentração) com peso médio de $29,25 \pm 5,90$ g e comprimento total de $11,30 \pm 0,93$ cm, como ilustrado na (figura 3). Foram utilizados os mesmos procedimentos adotados no primeiro ensaio experimental. No entanto, neste novo ensaio amostras de sangue foram coletadas de seis peixes de cada concentração, nos seguintes tempos: 1 h após a anestesia e 24 h após recuperação. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x2). Para coleta de amostras sanguíneas, os peixes foram capturados cuidadosamente e contidos em panos úmidos, onde a extração de sangue (300 $\mu\text{L L}^{-1}$) foi realizada por punção caudal próxima a linha lateral. Para isso, foram utilizadas seringas de 3 mL banhadas previamente em EDTA (3%).



Rep= Nº de peixes/repetições

Total= 36 peixes (29,25 ± 5,90 g; 11,30 ± 0,93 cm)

Controle= 2000 µL L⁻¹ de álcool etílico

Figura 3. Delineamento e procedimento experimental do segundo ensaio anestésico da avaliação do óleo essencial de *Lippia origanoides* em diferentes concentrações como anestésico sob as variáveis hematológicas de juvenis de pacu *P. mesopotamicus*

Analises sanguíneas

Alíquotas de sangue foram usadas para quantificar a glicose sanguínea (mg dL⁻¹) mensurada através do glicosímetro digital (G-tech, Lite). Outra alíquota do sangue, foi usada para determinar a porcentagem de hematócritos (Ht) por meio do método de microhematócrito de Goldenfarb et al. (1971). Hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método de cianometahemoglobina proposto por Collier (1944). A contagem do número de red blood cells (RBC's) foi realizada em câmara de Neubauer utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (Axio Scope.A1 Zeiss®) (40 x). Além desses, os índices hematimétricos foram calculados, sendo: volume corpuscular médio (VCM) = Ht x 10/Er, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = Hb x 100/Ht e hemoglobina corpuscular média (HCM) = (Hb/Er)*10.

Para a contagem total de leucócitos foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata de cada animal, secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright conforme descrito por Tavares-Dias and Moraes (2006).

Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade de variâncias (Levene Test). Para os dados de tempo de indução e recuperação da anestesia foram realizadas ANOVA, em seguida, análises de regressão foram

aplicadas ($p < 0,05$). Os dados de VF durante a indução e recuperação não atenderam aos pressupostos da ANOVA, logo foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Para as variáveis sanguíneas, confirmada a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à ANOVA em esquema fatorial 3x2 (3 tratamentos e 2 tempos de coleta), e teste de Tukey ($p < 0,05$) para observar possíveis diferenças significativas e os desdobramentos das interações dos tratamentos e tempos de coleta. As análises dos dados foram realizadas com software Infostat.

3. Resultados

Nenhuma mortalidade foi observada durante ou após sete dias do fim do experimento e todos os peixes voltaram a se alimentar dentro de 48 h após o teste.

O EOLO nas concentrações 0 e 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ não foram capazes de induzir a anestesia profunda, sendo assim, a análise foi realizada a partir da concentração de $\mu\text{L L}^{-1}$ do EOLO. Logo, para as outras concentrações avaliadas, o tempo de indução apresentou efeito quadrático ($p < 0,05$), com ponto de mínimo em 333,87 $\mu\text{L L}^{-1}$ (73,71 s) (Fig. 2A). O tempo de recuperação também apresentou efeito quadrático ($p < 0,05$), com ponto de mínimo em 93,02 $\mu\text{L L}^{-1}$ (253 s) (Fig. 2B).

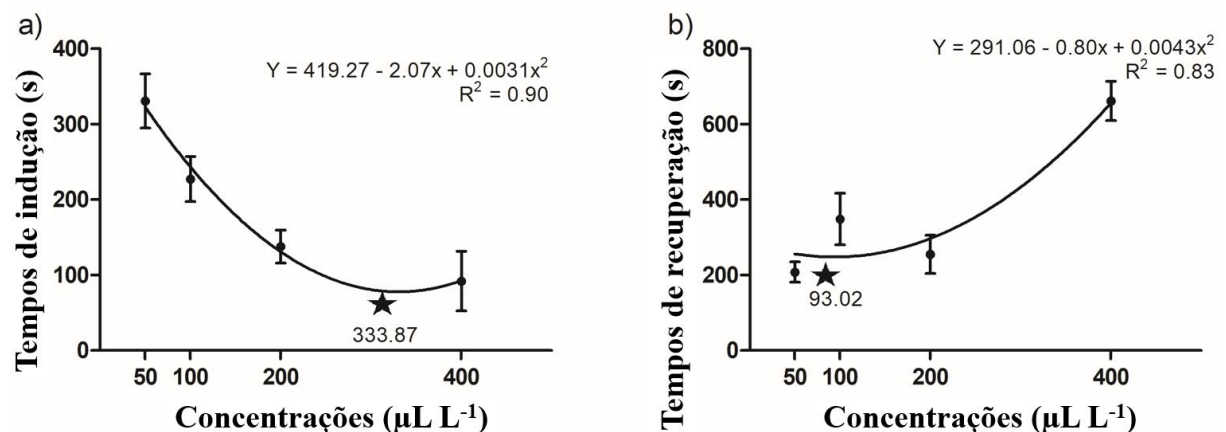


Figura 2. Tempo necessário para indução anestésica (A) e recuperação (B) de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO). Os dados foram analisados por análises de regressão ($p < 0,05$). Estrelas representam o valor estimado pela equação derivada.

Durante a indução da anestesia, a maior VF foi observada para os peixes expostos a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em relação aos animais submetidos as demais concentrações de EOLO avaliadas ($p < 0.05$). Durante a recuperação, a menor VF foi observada para os animais expostos a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em comparação aos peixes submetidos as demais concentrações de EOLO estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Valores (média $\pm$ desvio padrão) da frequência de ventilação (batimentos operculares por minuto) durante a indução e recuperação da anestesia em *Piaractus mesopotamicus*, submetidos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO). Médias seguidas de letras diferentes em uma coluna diferem pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Concentrações EOLO ($\mu\text{L L}^{-1}$)	frequência de ventilação na indução (batimentos min^{-1})	frequência de ventilação na recuperação (batimentos min^{-1})
50	65,55 $\pm$ 4,62 b	64,01 $\pm$ 2,92 a
100	65,00 $\pm$ 2,00 b	62,94 $\pm$ 1,70 a
200	64,46 $\pm$ 2,23 b	62,92 $\pm$ 1,67 a
400	84,08 $\pm$ 14,61 a	60,64 $\pm$ 0,78 b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis.

No segundo ensaio, não houve interação entre as concentrações de EOLO e os tempos de coleta de sangue para todas as variáveis avaliadas ($p > 0.05$) (Tabela 2). Contudo, peixes submetidos a 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO apresentaram maiores valores de RBCs em comparação aos animais expostos as concentrações 0 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO ($p < 0.05$), porém não houve diferença entre os tempos de coleta ($p > 0.05$). Os valores de glicose, hemoglobina e leucócitos não diferiram significativamente entre as concentrações de EOLO ($p > 0.05$). Entretanto, os valores mais altos para essas variáveis foram observados 1 h após anestesia, porém reduzidos após 24 h ($p < 0.05$). Não houve interação entre as concentrações de EOLO e os tempos de coleta de sangue para os índices hematimétricos estudados ($p > 0.05$) (Tabela 3). Os valores de CHCM não diferiram significativamente entre as concentrações de EOLO ($p > 0.05$). Entretanto, os valores mais altos para essa variável foram observados 1 h após anestesia, com redução após 24 h ($p < 0.05$).

1809 Tabela 2. Valores (média $\pm$ desvio padrão) das variáveis bioquímicas e hematológicas em dois tempos de coleta de sangue para *Piaractus mesopotamicus*
 1810 exposto a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO). Médias seguidas de letras diferentes em uma coluna diferem pelo
 1811 teste de Tukey ($p < 0,05$); Grupo controle: 2000 μL de álcool L^{-1} ; Hemoglobina (Hem), Hematócrito (Hemat), Eritrócitos (Eri), Leucócitos (Leu),
 1812 Volume corpuscular médio (VCM), Concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) e Hemoglobina corpuscular média (HCM); CV =
 1813 Coeficiente de variação.

		Glicose (mg dL^{-1})	Hem. (g dL^{-1})	Hemat. (%)	Eri. ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	Leu ($\times 10^3 \text{ mL}^{-1}$)	VCM (fL)	CHCM (g dL^{-1})	HCM (pg)
Concentrações ($\mu\text{L L}^{-1}$)	0 (Controle)	83,80 $\pm$ 24,61	12,01 $\pm$ 4,99	24,00 $\pm$ 5,60	2,04 $\pm$ 0,09	28,04 $\pm$ 5,61	124,14 $\pm$ 18,16	45,47 $\pm$ 15,27	59,01 $\pm$ 25,40
	50	92,83 $\pm$ 33,16	11,61 $\pm$ 3,19	26,00 $\pm$ 3,35	2,02 $\pm$ 0,21	23,36 $\pm$ 7,09	133,95 $\pm$ 16,32	44,08 $\pm$ 14,42	60,22 $\pm$ 16,01
	200	86,09 $\pm$ 31,5	11,14 $\pm$ 4,94	25,91 $\pm$ 6,77	1,98 $\pm$ 0,18	28,57 $\pm$ 7,77	115,80 $\pm$ 29,80	43,62 $\pm$ 20,42	54,05 $\pm$ 20,69
Tempos de coleta (h)	1	104,25 $\pm$ 30,06 a	14,48 $\pm$ 3,20 a	27,00 $\pm$ 6,04	2,08 $\pm$ 0,15 a	31,03 $\pm$ 5,24 a	129,23 $\pm$ 26,80	54,98 $\pm$ 11,65 a	69,26 $\pm$ 14,85
	24	72,41 $\pm$ 19,50 b	8,79 $\pm$ 3,36 b	23,82 $\pm$ 4,60	1,94 $\pm$ 0,15 b	21,79 $\pm$ 5,08 b	118,92 $\pm$ 16,54	34,41 $\pm$ 14,37 b	43,39 $\pm$ 17,27
Média geral		88,33 $\pm$ 24,78	11,64 $\pm$ 3,28	25,41 $\pm$ 5,32	2,01 $\pm$ 0,15	26,41 $\pm$ 5,16	124,08 $\pm$ 21,67	44,69 $\pm$ 13,01	56,32 $\pm$ 16,06
p-value Concentrações (A)		0,7691	0,8411	0,6165	0,6962	0,3542	0,1869	0,8781	0,2665
p-value Tempos de coleta (B)		0,0020	0,0001	0,1119	0,0218	0,0003	0,1290	0,0005	0,0002
p-value Interação (A x B)		0,8728	0,6622	0,6616	0,0659	0,3651	0,9589	0,1333	0,3795
CV (%)		30,23	29,87	21,78	7,23	19,22	18,06	29,01	27,20

1814

1815

1816

4. Discussão

No presente estudo, o principal composto do EOLO foi o carvacrol (49.7%), que corresponde ao quimiotipo carvacrol de *L. origanoides* (Stashenko et al. 2010). O efeito anestésico do EOLO em peixes era esperado, pois no estudo de Becker et al. (2018), o óleo essencial de *L. origanoides* (47.2% carvacrol) induziu anestesia de silver catfish *Rhamdia quelen*. De acordo com Keene et al. (1998) e Ross & Ross (2008), a concentração ideal de um determinado anestésico para peixes deverá induzir a anestesia em até 180 s e promover a recuperação dentro de 300 s. No presente estudo, a ação anestésica do EOLO foi obtida utilizando concentrações de pelo menos 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. Ademais, na concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO, o efeito anestésico ocorreu em 212 s, e a anestesia rápida foi alcançada em 145 e 92 s utilizando 200 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, Silva et al. (2019) trabalhando com o óleo essencial de *L. origanoides*, obtiveram anestesia em *C. macropomum* utilizando 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOZO, apresentando rápido tempo para indução anestésica (120 s), porém com longos tempos de recuperação. Becker et al. (2018) relataram que concentrações entre 50 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOZO causam anestesia em *R. quelen*, podendo ser utilizadas para anestesia rápida (< 180 s), porém também relataram longo tempo para recuperação total. No presente estudo, apenas a concentração de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO promoveu o tempo de recuperação dentro do limite recomendado por Ross and Ross (2008).

O EOLO necessita de diluição em álcool etílico; apesar disso, esse solvente em baixas concentrações não apresenta efeito indutor e não causa mortalidade em peixes (Becker et al. 2018; Silva et al. 2019), como também observado para os animais do tratamento controle do presente estudo. Além disso, as diferentes concentrações de EOLO estudadas não provocaram mortalidade durante, após a recuperação e nos 7 dias subsequentes do experimento que foi avaliada a sobrevivência dos peixes, e todos animais voltaram a se alimentar. Similarmente, Ferreira et al. (2021b) informaram que ao anestésiar duas classes de tamanhos de juvenis de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) com diferentes concentrações de mentol e eugenol observaram 100% de sobrevivência e todos os animais retomaram a alimentação após o fim dos experimentos. Esses resultados sugerem que os exemplares de *P. mesopotamicus* submetidos as diferentes concentrações de EOLO se recuperaram bem do manejo adotado (anestesia e biometria).

No presente estudo, durante a indução, a concentração de 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO causou redução na FV de juvenis de *P. mesopotamicus*, o que corresponde à concentração recomendada para esta espécie. Desta forma, foi possível imobilizar o peixe de maneira segura e tranquila,

tanto para o animal quanto para o manipulador, durante a biometria. A hipoventilação e, consequentemente, a diminuição do consumo de oxigênio em peixes pode ocorrer devido a anestesia (Houston et al. 1971), como pode ser observado neste estudo.

Em geral, peixes em situações estressantes liberam catecolaminas e corticosteroides que ativam os processos de glicogenólise e gliconeogênese, a fim de mobilizar reservas energéticas, com observação no aumento de glicose na corrente sanguínea para que o corpo animal escape ou se ajuste as novas condições fisiológicas impostas pelo ambiente (Barton e Iwama 1991; Pankhust 2011; Jerez-Cepa e Ruiz-Jarabo 2021). A hiperglicemia nos peixes foi observada 1 h após a anestesia e biometria. Esse fato pode ser compreendido como resultado do desencadeamento da glicogenólise e elevação nos níveis de glicose sanguínea durante a manipulação dos peixes, conforme também observado por Iwama et al. (2004). Por outro lado, o tempo de jejum ao qual os animais foram submetidos, podem ter reduzido os estoques de glicogênio e causado aumento nos níveis de glicose, como informado por Ribeiro et al. (2013). Similarmente, Ferreira et al. (2021b) ao anestesiarem juvenis de pirapitinga *P. brachypomus* com diferentes concentrações de mentol observaram aumento nos valores de glicose plasmática 1 h após anestesia.

No presente estudo, o aumento dos níveis de hemoglobina em peixes observados 1 h após a anestesia indica maior capacidade de transporte de oxigênio pelos eritrócitos, essa elevação da hemoglobina também pode ser ocasionada por alterações na frequência de batimentos operculares observadas no primeiro ensaio experimental, que pode influenciar no aumento do fluxo sanguíneo branquial (Becker et al., 2012). Outro fator que pode influenciar na presença de níveis mais elevados de hemoglobina é a glicose, pois, quanto maior a quantidade de glicose no sangue mais intensa será sua interação com a hemoglobina, com possível incremento dos níveis de hemoglobina, pela formação da hemoglobina glicada (Santin et al., 2013), como observado no presente trabalho após 1h do ensaio anestésico. Diferentes estudos têm demonstrado que essas alterações ocorrem em resposta ao aumento da demanda fisiológica imposta por uma situação estressante (Ventura et al. 2020; 2021). Portanto, essas alterações hematológicas observadas indicam que EOLO não foi eficaz na mitigação dos efeitos fisiológicos do estresse induzido ocasionado pelo manejo adotado (anestesia e biometria), exigindo mecanismos de resposta adaptativa dos animais após a manipulação. Contudo, após 24 h de recuperação, os níveis de hemoglobina retornaram à homeostase.

Elevações nos valores de leucócitos pode ocorrer para a maioria das espécies de peixes em situações de estresse, sendo considerada uma tentativa de recuperação da homeostase (Ranzani-Paiva et al. 2013). Esse fato foi observado no presente estudo nos peixes após 1 h de anestesia e manejo biométrico. Por outro lado, ao avaliar o efeito de banhos terapêuticos com

óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (300 mg L⁻¹) para juvenis de *C. macropomum*, Luz et al. (2021) encontraram diminuição do número de leucócitos e informaram que isso ocorreu devido ao efeito anestésico desse óleo. É importante enfatizar que as oscilações nas respostas hematológicas de diferentes espécies de peixes podem estar relacionadas a fatores exógenos e endógenos (Ahmed et al. 2020), bem como ao nível de estresse e ao tempo de exposição.

5. Conclusões

A concentração de 200 µL L⁻¹ EOLO pode ser recomendada para anestesia profunda de juvenis de *P. mesopotamicus*, pois causa anestesia dentro dos intervalos de tempo de indução e recuperação considerado ideal para peixes. Além disso, a concentração de 200 µL L⁻¹ EOLO foi capaz de reduzir a VF dos peixes durante a indução da anestesia. Entretanto, o EOLO não foi capaz de mitigar as respostas do estresse induzido causado pelo manejo de biometria, porém a maioria das variáveis sanguíneas retornaram aos valores normais em 24 h.

Agradecimentos

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil Código 01) pelas bolsas de doutorado e pós-doutorado dos discentes envolvidos na pesquisa. E a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-Brasil nº 71/049.087/2021) pelo apoio para o projeto de pesquisa.

6. Referências bibliográficas

- Ahmed I, Reshi QM, Fazio F (2020) The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquac Int* 28:869-899. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>
- Alvarenga CMD, Volpato GL (1995) Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiol Behav* 57:75-80. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00206-K](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00206-K)
- Aydin B, Barbas LAL (2020) Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520:734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>
- Barton BA, George KI (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* 1:3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)

- 1922 Becker AG, Parodi TV, Heldwein CG, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2012)
 1923 Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of
 1924 *Lippia alba*. Fish Physiology Biochemistry 38: 789-796. [https://doi.org/10.1007/s10695-011-](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4)
 1925 9562-4
- 1926 Becker AJ, Fogliarini CDO, Souza CDF, Becker AG, Mourão RHV, Silva LVFD,
 1927 Baldisserotto, B (2018) Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia*
 1928 *quelen*: a comparative approach between different essential oils. Rev Bras Zoot 47:e20170185.
 1929 <https://doi.org/10.1590/rbz4720170185>
- 1930 Boaventura TP, Souza CF, Ferreira AL, Favero GC, Baldissera MD, Heinzmann BM,
 1931 Baldisserotto B, Luz RK (2021) The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil during the
 1932 transport of *Lophiosilurus alexandri*: Water quality, hematology, blood biochemistry and
 1933 oxidative stress. Aquaculture 531:735964. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735964>
- 1934 Bolasina SN, Azevedo A, Petry AC (2017) Comparative efficacy of benzocaine, tricaine
 1935 methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. Aquac
 1936 Rep 6:56-60. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.002>
- 1937 Bolasina SN (2006) Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis*
 1938 *brasilensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. Aquac Int 14:569-575.
 1939 <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9055-0>
- 1940 Boyd CEB, Lim CL, Queiroz JF, Salie KS, de Wet L, McNevin A (2008) Best management
 1941 practices for responsible aquaculture (Vol. 10), Washington, DC: USAID, pp 47
- 1942 Carter KM, Woodley CM, Brown RS (2011) A review of tricaine methanesulfonate for
 1943 anesthesia of fish. Rev Fish Biol Fisher 21:51-59. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9188-0>
- 1944 Collier HB (1944) Standardization of blood haemoglobin determinations. Can Med Assoc
 1945 50:550-552.
- 1946 Costa OTF, Dias LC, Malmann CSY, Lima FCA, Carmo IB, Wischneski AG, Souza RL,
 1947 Cavero BAS, Lameiras JLV, Dos-Santos MC (2019) The effects of stocking density on the
 1948 hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui
 1949 (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. Aquaculture 499:260-268.
 1950 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.040>
- 1951 da Rosa Coelho J, Rosa KV, Rocha JS, Ramírez NCB, Maraschin M, do Nascimento Vieira F
 1952 (2021) In vitro antimicrobial activity of carvacrol against shrimp pathogens and its use as feed
 1953 additive for the pacific white shrimp. Boletim do Instituto de Pesca 47: 1-9.
 1954 <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2021.47.e645>
- 1955 Davis KB, Griffin BR (2004) Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by
 1956 several anesthetics. Aquaculture 233:531-548.

- 1957 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.018>
- 1958 Ebhohimen IE, Okolie NP, Okpeku M, Unweator M, Adeleke VT, Edemhanria L (2023)
- 1959 Evaluation of the Antioxidant Properties of Carvacrol as a Prospective Replacement for Crude
- 1960 Essential Oils and Synthetic Antioxidants in Food Storage. *Molecules* 28: 1315.
- 1961 <https://doi.org/10.3390/molecules28031315>
- 1962 Ferreira D, Barcellos LJG (2008) Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as
- 1963 medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. *Bol Inst Pesca* 34:601-611.
- 1964 Ferreira AL, Silva WDS, Carmo NL, Ferreira NS, Takata R, Luz RK (2020) Benzocaine and
- 1965 menthol as anesthetics for the African cichlid *Aulonocara nyassae*. *Aquac Int* 28:1837-1846.
- 1966 <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00561-w>
- 1967 Ferreira AL, Favero GC, Boaventura TP, de Freitas Souza C, Ferreira NS, Descovi SN,
- 1968 Baldisserotto B, Luz RK (2021a) Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753):
- 1969 efficacy for anesthesia and transport of *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 47:135-
- 1970 152. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00900-x>
- 1971 Ferreira AL, Bonifácio CT, de Silva WDS, Takata R, Favero GC, Luz RK (2021b) Anesthesia
- 1972 with eugenol and menthol for *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): Induction and recovery
- 1973 times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. *Aquaculture*
- 1974 544:737076. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737076>
- 1975 Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosious E (1971) Reproducibility in the hematology
- 1976 laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol* 56:35-39.
- 1977 <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- 1978 Hoseini SM, Taheri Mirghaed A, Yousefi M (2019) Application of herbal anaesthetics in
- 1979 aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 11:550-564. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>
- 1980 Houston AH, Madden JA, Woods RJ, Miles HM (1971) Some physiological effects of handling
- 1981 and tricaine methanesulphonate anesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J*
- 1982 *Fish Res Board Can* 28:625-633. <https://doi.org/10.1139/f71-093>
- 1983 Iwama GK, Afonso LO, Todgham A, Ackerman P, Nakano K (2004) Are hsps suitable for
- 1984 indicating stressed states in fish? *J Exp Biol* 207:15-19. <https://doi.org/10.1242/jeb.00707>
- 1985 Jerez-Cepa I, Ruiz-Jarabo I (2021) Physiology: an important tool to assess the welfare of
- 1986 aquatic animals. *Biology* 10:61. <https://doi.org/10.3390/biology10010061>
- 1987 Keene JL, Noakes DLG, Moccia RD, Soto CG (1998) The efficacy of clove oil as an anaesthetic
- 1988 for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 29:89-101.
- 1989 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927>
- 1990 Luz JGR, Nogueira JN, Alves CMG, Videira MN, Canuto KM, Castro KNC, Tavares-Dias M
- 1991 (2021) Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) has anthelmintic efficacy against

- 1992 monogenean of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae). *Aquac Res*
 1993 52:5340-5349. <https://doi.org/10.1111/are.15404>
- 1994 Pankhurst NW (2011) The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen*
 1995 *Comp Endocrinol* 170:265-275. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>
- 1996 Park MO, Hur WJ, Im SY, Seol DW, Lee J, Park IS (2008) Anaesthetic efficacy and
 1997 physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquac*
 1998 *Res* 39:877–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>
- 1999 Park IS, Lee TH, Lim SG (2018) Anesthetic efficacy and physiological responses of clove oil
 2000 on juvenile and adult red spotted grouper, *Epinephelus akarra*. *Fish Aquatic Sci* 21:1-6.
 2001 <https://doi.org/10.1186/s41240-018-0100-5>
- 2002 Pellegrin L, Copatti CE, Pinto DDSB, Nitz LF, Wasielesky JRW, Garcia L (2023) Effect of
 2003 different stocking densities on hematological parameters and zootechnical performance of pacu
 2004 (*Piaractus mesopotamicus*) in the BFT system. *Aquaculture* 576:739852.
 2005 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739852>
- 2006 Purbosari N, Warsiki E, Syamsu K, Santoso J (2019) Natural versus synthetic anesthetic for
 2007 transport of live fish: A review. *Aquac Fish* 4:129–133.
 2008 <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.03.002>
- 2009 Matsche MA (2017) Efficacy and Physiological Response to Chemical Anesthesia in Wild
 2010 Hickory Shad during Spawning Season. *Mar Coast Fish* 9:296-304.
 2011 <https://doi.org/10.1080/19425120.2017.1321593>
- 2012 Morgan JD, Iwana GK (1997) Measurements of stressed states in the field In: Iwana G W,
 2013 Pickering AD, Sumpster JP, Schreck CB (Eds.) (1997) *Fish stress and health in aquaculture*.
 2014 Cambridge: University Press 247-270 pp.
- 2015 Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia:
 2016 considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J* 50:343-360.
 2017 <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>
- 2018 Oliveira MIB, Brandão FR, Tavares-Dias M, Barbosa BCN, Rocha MJS, Matos LV, Souza
 2019 DCM, Majolo C, Oliveira MR, Chaves FCM, Chagas EC (2024) Essential oils of *Ocimum*
 2020 *gratissimum*, *Lippia grata* and *Lippia origanoides* are effective in the control of the
 2021 acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma*
 2022 *macropomum*. *Aquaculture* 578:740043. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740043>
- 2023 Ranzani MJT de, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI (2013) Métodos para análise
 2024 hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM 140p.
- 2025 Readman GD, Owen SF, Knowles TG, Murrell JC (2017) Species specific anaesthetics for fish
 2026 anaesthesia and euthanasia. *Sci Rep* 7:7102. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06917-2>

- Ribeiro PAP, Miranda Filho KC, Melillo Filho R, Santos AEH, Souza WS, Rodrigues LA, Luz RK (2013) Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. *Pesqui Agropecu Bras* 48:1136–1139. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800048>.
- Ross LG, Ross B (2008) *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Oxford, Blackwell Science, 3rd Ed, p. 222
- Santos-Filho LGD, Reis RB, Souza ASQ, Canuto KM, Brito ES, Castro KN, Pereira AML, Diniz FM (2023) Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. *An Acad Bras Cienc* 95:e20220359. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220359>
- Shaluei F, Hedayati A, Jahanbakhshi A, Baghfalaki (2012) Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. *Fish Physiol Biochem* 38:1627-1634. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9659-4>
- Silva LL, Parodi TV, Reckziegel P, de Oliveira Garcia V, Bürger ME, Baldisserotto B, Malmann CA, Pereira AMS, Heinzmann BM (2012) Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 350:91-97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.012>
- Silva HNP, Carvalho BCF, Maia JLS, Becker AG, Baldisserotto B, Heinzmann BM, Mourão RHV, da Silva LVF (2019) Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. *Cienc Rural* 49:1-6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20181059>
- Silva BADO, Ferreira AL, Acunha RMG, Almeida RGDS, dos Santos J G, Fernandes CE, Célio F, Chaves M, Chagas EC, Cardoso CAL, de Campos CM, Costa DC (2023) Anesthetic efficiency of essential oil of *Zingiber officinale* for *Astyanax lacustris*: induction time, recovery time, ventilatory frequency, and gill histopathology. *Aquac Int* 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01344-9>
- 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* 218:177-185. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00302-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00302-2)
- Soares BV, Cardoso ACF, Campos RR, Gonçalves BB, Santos GG, Chaves FCM, Chagas EC, Tavares-Dias M (2017) Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469:72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- Souza ADSL, Peret AC, Hamoy M, de Souza RAL, Torres MF, Barbas LAL (2019) Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui

- 2062 *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. Aquaculture 500:160-
2063 169. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.017>
- 2064 Souza CF, Baldissera MD, Baldisserotto B, Heizmann BM, Martos-Sitcha JA, Mancera JM
2065 (2019) Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. Front Physiol
2066 10:454552. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- 2067 Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, Cala M (2010) *Lippia*
2068 *origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component
2069 analysis. J Sep Sci 33:93-103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>
- 2070 Tavares-Dias M, Moraes FR (2006) Características hematológicas da Tilapia rendalli
2071 Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo.
2072 Brasil Biosci J 19:103-110.
- 2073 Tavares-Dias M, Moraes FR, Imoto ME (2008) Hematological parameters in two neotropical
2074 freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and *Prochilodus lineatus*
2075 (Prochilodontidae). Bioscience Journal 24: 96-101.
- 2076 Teixeira RR, de Souza RC, Sena AC, Baldisserotto B, Heinzmann B M, Couto RD, Copatti CE
2077 (2017) Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and
2078 sensory evaluation of fillets. Aquac Res 48:3383-3392. <https://doi.org/10.1111/are.13165>
- 2079 Uehara SA, Andrade DR, Takata R, Júnior AG, Vidal MV (2019) The effectiveness of tricaine,
2080 benzocaine, clove oil, and menthol as anesthetics for lambari-bocarra *Oligosarcus*
2081 *argenteus*. Aquaculture 502:326-331. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.054>
- 2082 Urbinati EC, Gonçalves FD (2005) Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto B,
2083 Gomes LC (ed) Espécies nativas para piscicultura no Brasil, Santa Maria, Editora UFSM, pp
2084 470.
- 2085 Valentim AM, Félix LM, Carvalho L, Diniz E, Antunes LMA (2016) New Anaesthetic Protocol
2086 for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine. PLoS One 11:0147747.
2087 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147747>
- 2088 Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2018) South American fish for continental
2089 aquaculture. Rev Aquac 10:351-369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>
- 2090 Ventura AS, Jerônimo GT, de Oliveira SN, de Araújo Gabriel AM, Cardoso CAL, Teodoro
2091 GC, Corrêa Filho RAC, Povh JA (2020) Natural anesthetics in the transport of Nile tilapia:
2092 Hematological and biochemical responses and residual concentration in the fillet. Aquaculture
2093 526:735365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735365>
- 2094 Ventura AS, Jerônimo GT, Corrêa Filho RAC, de Souza AI, Stringhetta GR, da Cruz MG,
2095 Torres GS, Gonçalves LU, Povh JA (2021) *Ocimum basilicum* essential oil as an anesthetic for
2096 tambaqui *Colossoma macropomum*: Hematological, biochemical, non-specific immune

2097 parameters and energy metabolism. Aquaculture 533:736124.
2098 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736124>
2099 Zahl IH, Samuelsen O, Kiessling A (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for
2100 welfare. Fish physiology and biochemistry 38:201-218. [https://doi.org/10.1007/s10695-011-](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1)
2101 9565-1
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131

CAPÍTULO 4

2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165

Óleo essencial de *Lippia origanoides* no transporte de *Piaractus mesopotamicus*: Avaliação de compostos residuais, fisiológica e da morfologia branquial

O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para publicação no periódico Aquaculture.

**Óleo essencial de *Lippia origanoides* no transporte de *Piaractus mesopotamicus*:
Avaliação de compostos residuais, fisiológica e da morfologia branquial**

***Lippia origanoides* essential oil on transport of *Piaractus mesopotamicus*:
Evaluation of residual compounds, Physiology and gills morphology**

Resumo

Na produção piscícola os peixes estão sujeitos a diversas situações que podem levar a quadros de estresse, como transporte, e a sedação com aditivos fitoterápicos naturais podem reduzir os efeitos do estresse. O objetivo do estudo foi verificar os efeitos da inclusão do óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO) na água do transporte de juvenis de pacu, sob as variáveis hematológicas, imunológicas, bioquímica, depleção residual e avaliação histológica das brânquias. Foram utilizadas cinco concentrações do EOLO (0, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{L L}^{-1}$) adicionado a água do transporte dos pacus ($n= 160$; $54,63 \pm 6,43$ g), transportados por quatro horas com análise de amostras coletadas em diferentes tempos do experimento (Antes do transporte, uma hora após, 24 horas após e 48 horas após). Para cada tratamento e os tempos de transporte foram avaliados os parâmetros hemato-imunológicos e bioquímica: Glicose, hemoglobina, hematócrito, número de eritrócitos, VCM, HCM, CHCM, leucócitos e trombócitos. Também foi avaliado a depleção residual do EOLO na carcaça dos pacus após o transporte e avaliação das alterações histológicas das brânquias (IAH). Não houve interação entre os tratamentos (concentrações de EOLO) e os tempos de coleta para glicose, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, HCM e leucócitos ($P > 0,05$). Pacus transportados com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO tiveram valores de glicose significativamente menores do que o grupo controle e demais concentrações avaliadas ($P < 0,05$). Os eritrócitos e trombócitos foram afetados pelo tratamento, tempo de coleta e sua interação ($P < 0,05$), os maiores valores de eritrócitos observados foram para pacus transportados com 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em comparação ao grupo controle. Já, os maiores valores de trombócitos observados foram para pacus transportados com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Na avaliação das médias das alterações histológicas das brânquias, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Na análise dos compostos residuais foi identificado o carvacrol em todos os tratamentos após o transporte, após 48 horas não foi mais possível encontrar o carvacrol no filé dos pacus. O uso de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO na água de transporte de 4 horas é capaz de manter níveis de glicose baixos durante o transporte e é promissor para garantir a sobrevivência e o bem-estar de juvenis de pacus, também não provocou lesões graves às brânquias dos juvenis de pacus.

Palavras-chave: Carvacrol, Hematologia, Histologia, Pacu, Sedativo fitoterápico

Abstract

In fish farming, fish are subject to several situations that can lead to stress, such as transportation, and the sedation with natural herbal additives can reduce the effects of stress. The aim of this study was to verify the effects of including *Lippia origanoides* essential oil (EOLO) in the water used to transport pacu juveniles on hematological, immunological, biochemical, residual depletion and histological evaluation of the gills. Five concentrations of EOLO (0, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{L L}^{-1}$) were added to the water used to transport pacus ($n = 160$; 54.63 ± 6.43 g), transported for four hours, with analysis of samples collected at different times during the experiment (before transport, one hour after, 24 hours after and 48 hours after). For each treatment and transport times, the hemato-immunological and biochemical parameters were evaluated: Glucose, hemoglin, hematocrit, number of erythrocytes, MCV, MCH, MCHC, leukocytes and thrombocytes. The residual depletion of EOLO in the pacu carcass after transport and evaluation of histological changes in the gills AHI were also evaluated. There was no interaction between treatments (EOLO concentrations) and collection times for glucose, hematocrit, hemoglobin, MCV, MCHC, MCH and leukocytes ($P > 0.05$). Pacus transported with 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO had significantly lower glucose values than the control group and other concentrations evaluated ($P < 0.05$). Erythrocytes and thrombocytes were affected by treatment, collection time and their interaction ($P < 0.05$), the highest erythrocyte values observed were for pacus transported with 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO compared to the control group. On the other hand, the highest thrombocyte values observed were for pacus transported with 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO compared to the control group ($p < 0.05$). In the evaluation of the means of histological changes of the gills, no significant differences were observed ($p > 0.05$). In the analysis of residual compounds, carvacrol was identified in all treatments after transport; after 48 hours, it was no longer possible to find carvacrol in the pacu fillets. The use of 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO in the transport water for 4 hours is capable of maintaining low glucose levels during transport and is promising for ensuring the survival and well-being of pacu juveniles. It also did not cause serious lesions to the gills of pacu juveniles.

Keywords: Carvacrol, Hematology, histology, Phytotherapeutic sedative, Pacu

Introdução

Anestésicos são ferramentas essenciais na aquicultura, amplamente utilizados para acalmar, capturar, transportar, amostrar, medir e manusear peixes (Ferreira et al. 2020; Ventura et al. 2020; Liu et al. 2022; Oliveira et al. 2024a). Entre os anestésicos mais comuns estão tricaine methanesulfonate (MS-222), quinaldina, benzocaína, metomidato, propofol, óleo de cravo, eugenol e 2-fenoxietanol (Neiffer e Stamper 2009). Porém, a literatura relata que alguns anestésicos sintéticos podem causar efeitos colaterais graves, como irritação das brânquias, secreção excessiva de muco e supressão dos sistemas cardiovascular, respiratório e imunológico dos peixes (Souza et al. 2019; Aydın e Barbas 2020).

Nesse sentido, os óleos essenciais extraídos de plantas têm se destacado como alternativas promissoras aos anestésicos sintéticos (Purbosari et al. 2019), devido principalmente às suas propriedades bioativas multifacetadas, que incluem efeitos anestésicos e/ou sedativos, imunoestimulantes, antioxidantes e antimicrobianos (Souza et al. 2019; Almeida et al. 2021; Dawood et al. 2022). Nesse contexto, a adição de óleos essenciais na água de transporte de peixes em sacos plásticos pode preservar a qualidade da água, reduzir o estresse e aumentar as taxas de sobrevivência (Ventura et al. 2020; Boaventura et al. 2021; Ferreira et al. 2022).

Nos atuais estudos de sedação e anestesia durante o manejo estressante de peixes, a avaliação histopatológica de tecidos, pode auxiliar na compreensão, avaliação e prevenção dos efeitos do estresse e de quadros patogénicos, como nas avaliações das brânquias e fígado, uma vez que, são órgãos cruciais para avaliar a sensibilidade dos tecidos expostos a substâncias tóxicas e diferentes alterações no ambiente aquático (Evans et al. 2005; Brandão et al. 2021; Martins et al. 2018; Silva et al. 2023). A técnica de avaliação ocorre pela visualização dos tecidos seccionados e corados em lâmina permitindo avaliação de possíveis alterações celulares e teciduais (Martins et al. 2018).

Na utilização de sedativos e anestésicos na piscicultura também é importante realizar a avaliação da deposição desses compostos nos diferentes tecidos dos peixes, pois, essa deposição pode afetar negativamente as características organolépticas da carne, com a análise da depleção residual desses componentes sendo uma medida importante para o consumo seguro da carne (Meinertz et al., 1996; Guenette et al., 2007).

Nesse contexto, a *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae), é uma planta arbustiva aromática encontrada desde o sul da América do Norte ao norte da América do Sul, seu consumo tem sido atribuído principalmente por suas propriedades terapêuticas e

culinárias (Oliveira et al. 2007; Soares et al. 2017). Na aquicultura, o óleo essencial de *L. origanoides* (EOLO) demonstrou efeitos anestésicos em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Silva et al. 2019) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (Bandeira-Junior et al. 2019). Ademais, o EOLO também mostrou capacidade terapêutica contra patógenos de peixes, sendo capaz de reduzir o estresse e doenças (Oliveira et al. 2024b). No entanto, os efeitos específicos da adição do EOLO na água de transporte de peixes vivos permanecem ainda desconhecidos.

Dentre as espécies nativas produzidas no país, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa com ampla distribuição na América do Sul, na bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Urbinati et al., 2013). Possui extenso potencial para produção piscícola, pela sua rusticidade, fácil adaptação as condições de cultivo, hábito alimentar onívoro e aceitação no mercado consumidor (Signor et al., 2010).

Assim, o objetivo do atual estudo foi investigar à adição de diferentes concentrações de EOLO na água de transporte de juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em sacos plásticos, avaliando seus efeitos nos parâmetros de qualidade da água, nas respostas fisiológicas e histopatológicas, e nos compostos residuais no filé.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Excelência em Ciência Animal do Cerrado e Pantanal (CECA), da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, nº 008/2023) da UEMS.

Colheita, preparação e perfil químico do EOLO

Espécimes de *L. origanoides* foram cultivadas no setor de plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). Após a colheita, as folhas frescas foram usadas para extração do óleo essencial de *L. origanoides* (EOLO) que ocorreu por hidrodestilação em aparelho Clevenger (2 h) e armazenado em frasco âmbar a -4 °C. A composição química do EOLO foi determinada por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS) no Laboratório de Análise Instrumental do Centro de Estudos em Recursos Naturais da UEMS (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil).

2330 Para preparação das soluções estoques, foi utilizado álcool etílico (99,5%) em
2331 todas as concentrações EOLO (1:10, V/V) para promover sua completa dissolução em
2332 água. No tratamento controle (0 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO) foi usado o maior volume de álcool gasto
2333 para diluir a maior concentração de EOLO, ou seja, 200 μL de álcool etílico L^{-1} .

2334

2335 *Animais e aclimação*

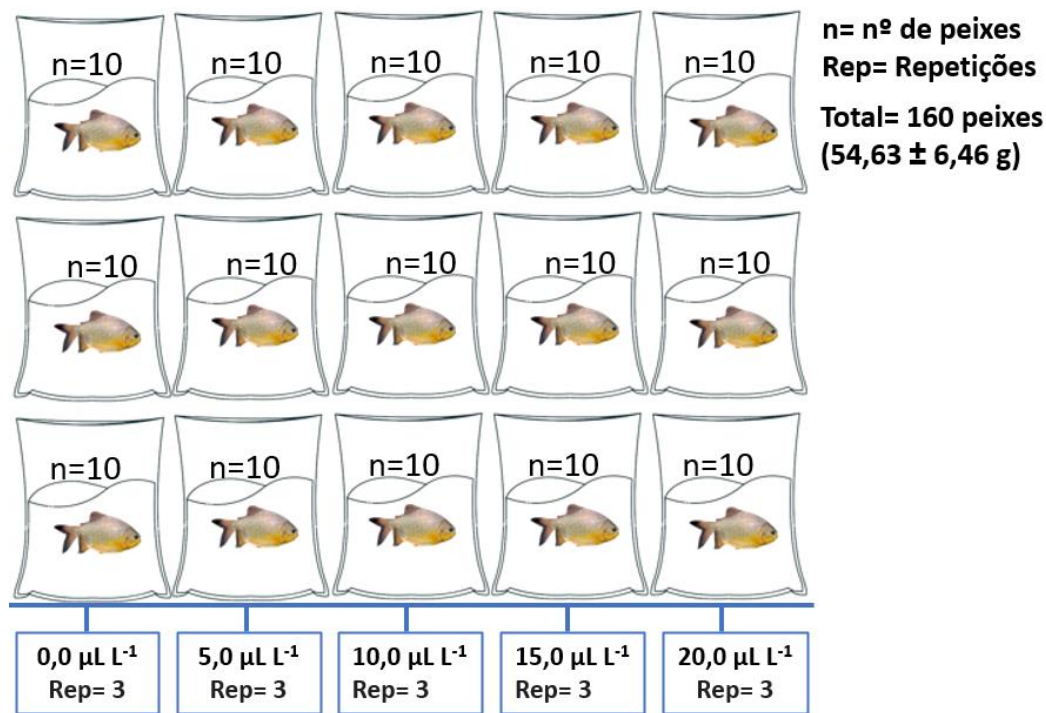
2336 Espécimes de *P. mesopotamicus* foram adquiridas do setor de Piscicultura, do
2337 CECA/UEMS. Os peixes foram aclimatados por duas semanas em tanques circulares de
2338 polietileno (350 L), em sistema de circulação de fluxo contínuo de água e aeração
2339 constante. A temperatura da água esteve em $26,38 \pm 0,12$ C°, o pH entre $6,49 \pm 0,07$, o
2340 oxigênio dissolvido de $5,67 \pm 0,20$ mg L^{-1} , e amônia total de $0,31 \pm 0,06$ mg L^{-1} . Os
2341 parâmetros de qualidade de água foram mensurados três vezes durante a semana, cerca
2342 de 30 min antes do fornecimento da ração. Os animais foram alimentados com dieta
2343 comercial (36% de proteína bruta - Supra, ACQUAline), duas vezes ao dia (09:00 e
2344 16:00), até a saciedade aparente. Previamente ao experimento, todos os peixes foram
2345 submetidos ao jejum de 24 h.

2346

2347 *Procedimento experimental*

2348 Espécimes de pacus ($n = 160$; peso médio= $54,63 \pm 6,46$ g) foram utilizados neste
2349 experimento e distribuídos, aleatoriamente, em 15 sacos plásticos de 80 x 60 cm (unidades
2350 experimentais), com um volume total de 60 L, contendo 20 L de água, 2/3 de oxigênio
2351 puro, na densidade de 10 peixes por saco. O delineamento experimental foi inteiramente
2352 casualizado, em cinco tratamentos e três repetições cada como ilustrado na figura 1., a
2353 saber: grupo de peixes transportados com 0 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO, ou seja, 200 μL de álcool
2354 etílico L^{-1} (Tratamento controle), grupo de peixes transportados com 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO
2355 (Tratamento 1), grupo de peixes transportados com 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO (Tratamento 2),
2356 grupo de peixes transportados com 15 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO (Tratamento 3) e grupo de peixes
2357 transportados com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO (Tratamento 4). A água usada para enchimento dos

2358 sacos plásticos esteve com temperatura de $26,89 \pm 0,52$, pH de $6,49 \pm 0,22$, oxigênio
2359 dissolvido em torno de $4,32 \pm 0,83 \text{ mg L}^{-1}$ e amônia total de $0,05 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$.



2360 Figura 1. Delineamento experimental de juvenis de pacu *P. mesopotamicus* transportados
2361 com água contendo diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

2362 Os sacos plásticos foram fechados (8:00 h) e transportados em um veículo
2363 utilitário por 4 h (Becker et al. 2012). Após o fim do transporte, os sacos foram abertos e
2364 os parâmetros de qualidade da água foram imediatamente mensurados. Dois peixes de
2365 cada saco foram amostrados para colheita de sangue e tecido (brânquias) nos seguintes
2366 tempos: 0 (imediatamente ao fim do transporte), 24 e 48 h após o transporte (n = 6 peixes
2367 por tratamento em cada tempo). Um grupo de 10 peixes que não foram transportados, no
2368 início do experimento foram amostrados aleatoriamente para coleta de sangue e tecidos,
2369 sendo estes considerados valores de referência (basal).

2370 Os peixes restantes de cada tratamento foram realocados em cinco tanques
2371 circulares (semelhante as condições de aclimação) para avaliação da taxa de
2372 sobrevivência e retorno à alimentação durante sete dias.

2373
2374
2375
2376
2377

2378 *Parâmetros de qualidade da água*

2379 Os parâmetros de qualidade da água foram mensurados antes e logo após o fim do
2380 transporte. A temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram medidos usando uma sonda
2381 multiparâmetro (HI9894 - Hanna®). A amônia total foi quantificada através do
2382 fotocolorímetro de bolso (Hanna Checker – HI7 15).

2383

2384 *Coleta de sangue e tecidos*

2385 Amostras de sangue (1,0 mL) foram coletadas de cada peixe por punção caudal
2386 com seringas banhadas com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 3%). Em seguida,
2387 os peixes foram eutanasiados, por meio de dessensibilização com gelo e concussão
2388 cerebral, para remoção de amostras teciduais. Amostras do primeiro arco branquial direito
2389 de cada peixe foram coletadas, identificadas, preparadas em solução de formol 10%
2390 tamponado (pH 7,2), para processamento de lâminas histológicas. Já, as amostras de filé
2391 foram coletadas, identificadas e posteriormente congeladas a -20 °C, para realização das
2392 análises de compostos residuais do EOLO.

2393

2394 *Análises de compostos residuais do EOLO no filé*

2395 As análises de compostos residuais do EOLO no filé de pacus foram realizadas no
2396 Laboratório de Análise Instrumental do Centro de Estudos em Recursos Naturais da
2397 UEMS (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil). Amostras de músculo fresco (10 g) foram
2398 extraídas com 50 mL de hexano grau cromatográfico em ultrassom por 30 min para
2399 avaliação dos compostos residuais do EOLO, conforme adotado recentemente por
2400 Moreira et al. (2024). Após a extração foi realizada a filtração e o resíduo sólido foi
2401 extraído novamente duas vezes pelo mesmo processo. Os filtrados obtidos foram unidos
2402 e o volume reduzido para 1 mL.

2403 As amostras foram submetidas a análise empregando um cromatógrafo gasoso
2404 (GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) acoplado a um espectrômetro de massas (GC-
2405 MS Ultra 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), realizado a análise. Utilizou-se uma coluna
2406 capilar de sílica fundida DB-5 (J and W, Folsom, California, USA) 5% de fenil-
2407 dimetilpolisiloxano em sílica fundida capilar (30 m de comprimento x 0,25 mm de

diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme). As condições de análise foram: rampa de aquecimento com temperatura inicial de 50 °C alcançando 280 °C à 3°C/ minutos permanecendo na temperatura final por 10 minutos. O hélio (99,999 %) foi empregado como gás de arraste (1 mL min⁻¹) e as injeções foram de 1 µL no modo split 1:20. As temperaturas do injetor, detector e da linha de transferência foram 250°C, 290°C e 290°C, respectivamente. Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, com m/z 45 a 600 e intervalo de varredura de 0,3 segundos.

As identificações das substâncias foram feitas utilizando o índice de retenção calculado (IC) empregando o padrão de alcanos lineares (C₇-C₄₀, Sigma Aldrich com pureza ≥ 98%), além de comparações do IC com os índices da literatura (Adams, 2007) e interpretação dos espectros de massas das amostras e da comparação com as bases de dados (NIST21 e WILEY229). A curva analítica foi construída por padronização externa para a quantificação residual carvacrol, sendo o constituinte majoritário do EOLO. A linearidade do método foi determinada pela curva de regressão linear empregando as concentrações 100, 50, 25, 10, 1,0; 0,5, 0,25 µg kg⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram avaliados em diferentes concentrações empregando a relação sinal ruído.

Análises sanguíneas

As análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Peixes da UEMS, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. Os valores de glicose sanguínea foram quantificados por meio do medidor de glicemia portátil digital (Accu Check Roche®). O hematócrito (%) foi mensurado através do método de microhematócrito (Goldenfarb et al. 1971) e a hemoglobina (g dL⁻¹) foi medida pelo método da cianometahemoglobina (Collier 1944). Amostras de sangue foram coletadas em duplicata de cada animal e as lâminas foram secas, à temperatura ambiente, e coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright, conforme descrito por Tavares-Dias e Moraes (2006), para contagem total de trombócitos e leucócitos pelo método indireto de Ishikawa et al. (2008), as leituras foram realizadas em microscópio óptico (1000×) com auxílio de contador digital. A contagem total de (eritrócitos) foram realizadas em câmara de Neubauer usando a diluição de 1:200 com solução de Dacie (citrato de sódio, cloreto de tolônio e formalina 37-40%). Os

2440 índices hematimétricos foram calculados da seguinte maneira: Volume corpuscular
 2441 médio – MCV (fL) = Hematócrito*10 / Eritrócitos; Hemoglobina corpuscular média -
 2442 MCH (pg) = Hemoglobina*10 / Número de eritrócitos; Concentração média de
 2443 hemoglobina corpuscular – MCHC (g dL⁻¹) = Hemoglobina*100 / Hematócrito, conforme
 2444 sugerido por Ranzani-Paiva et al. (2013).

2445

2446 *Histologia de brânquias*

2447 Amostras teciduais (brânquias) foram processadas através de técnicas histológicas
 2448 de rotina para cortes em parafina (3 µm), corados com Hematoxilina & Eosina (H&E)
 2449 (Carson e Cappellano, 2009). Para a análise histológica, imagens digitais (n=10) foram
 2450 capturadas aleatoriamente a partir das secções histológicas, utilizando uma câmera digital
 2451 acoplada a um microscópio (Leica DM5500 B) com aumento adequado para cada análise.
 2452 As análises histopatológicas foram realizadas com o software Imagej (Imagej®).

2453 Para as brânquias, foi coletado o primeiro arco branquial direito de cada peixe. A
 2454 análise histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa, com utilização de dois
 2455 critérios de avaliação: Critério 1 – Classificação das lesões nas brânquias baseado no tipo
 2456 e local da lesão separadas em cinco grupo (a= Hipertrofia e hiperplasia do epitélio das
 2457 brânquias e mudanças relacionadas; b= Alterações na mucosa e nas células cloreto; c=
 2458 parasitas de brânquias; d= Alterações nos vasos sanguíneos; e= Estágios terminais)
 2459 (Poleksic & Mitrovic-Tuntundzic, 1994).

2460 O critério 2 é a classificação em estágios das lesões branquiais do critério 1,
 2461 baseado no escopo de reparação das lesões, ou seja, a possibilidade de reparação da
 2462 estrutura do tecido branquial, separado em três estágios: 1= Alterações que não causam
 2463 danos severos sem possibilidade de reparação a partir de mudanças no ambiente e
 2464 condição dos peixes; 2= Alterações mais severas ocasionando efeitos negativos associado
 2465 as funções do órgão; 3= A restauração do tecido e estrutura das brânquias não é possível
 2466 (Poleksic e Mitrovic-Tuntundzic, 1994; Schwaiger et al., 1997). Então foi determinado o
 2467 índice de alteração histopatológica (HAI) determinado pelos estágios (1, 2 e 3) das
 2468 alterações nas brânquias, pela fórmula $HAI = \Sigma 1 + 10 * \Sigma 2 + 102 \Sigma 3$. O resultado encontrado
 2469 indica o grau de alterações nas brânquias dos peixes, sendo, 0 a 10 funcionamento normal
 2470 das brânquias; 11 a 20 alteração leve a moderada; 21 a 50 alterações moderadas a pesadas;
 2471 Acima de 100 danos irreparáveis (Poleksic & Mitrovic-Tuntundzic, 1994).

2472 *Análises estatísticas*

2473 A homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados foram avaliadas pelos
 2474 testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. As variáveis de qualidade da água e
 2475 de histopatologia de brânquias, medidas antes e logo após o transporte, foram analisadas
 2476 por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); além disso, o teste de
 2477 Dunnett ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar as concentrações de EOLO com o grupo
 2478 basal. Os parâmetros sanguíneos foram examinados por ANOVA de duas vias, seguida
 2479 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Já, os resultados dos compostos residuais do EOLO foram
 2480 analisados por análises descritivas. As análises estatísticas foram realizadas no software
 2481 SAS e Infostat.

2482

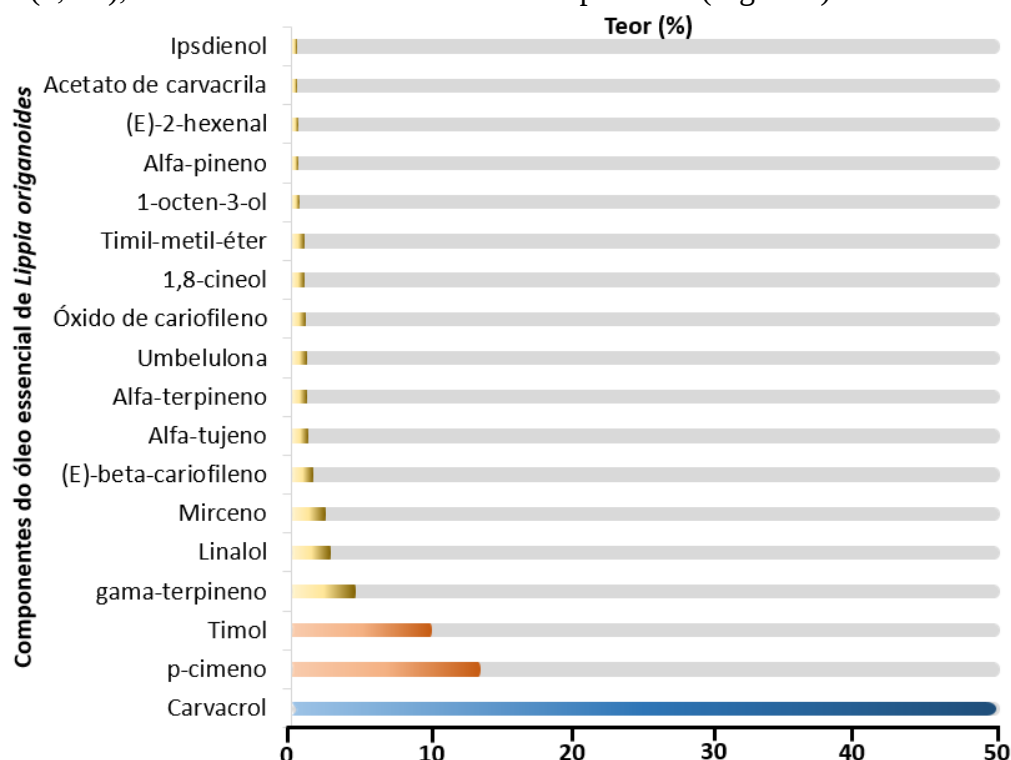
2483 **Resultados**

2484 A sobrevivência foi de 100% durante e após sete dias do fim do experimento.
 2485 Ademais, todos os peixes retomaram a alimentação em até 24 h.

2486

2487 *Composição química do EOLO*

2488 Os três principais compostos do EOLO são: carvacrol (49,7%), p-cimeno (13,3%)
 2489 e timol (9,9%), com menores níveis de outros componentes (Figura 2).



2490 **Figura 2.** Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

2491

2492 *Parâmetros de qualidade da água*

2493 Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) nas variáveis de qualidade da água
 2494 imediatamente após o transporte de juvenis de pacus expostos a diferentes concentrações
 2495 de EOLO (Tabela 1). Contudo, entre os diferentes tempos de transporte (Antes e após o
 2496 transporte) foram observadas diferenças ($P < 0,05$) para os valores de temperatura, pH e
 2497 amônia total.

2498

2499 **Tabela 1.** Variáveis de qualidade da água antes e após 4 h de transporte de juvenis de
 2500 *Piaractus mesopotamicus* (pacu) em sacos plásticos contendo água com diferentes
 2501 concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides* (EOLO)

Variáveis	Antes do transporte	Após o transporte (Tratamentos - EOLO)				
	Basal	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	5 $\mu\text{L L}^{-1}$	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	15 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	26,91 $\pm$ 0,24	32,11 $\pm$ 2,41 *	32,67 $\pm$ 0,61 *	32,87 $\pm$ 0,52 *	32,75 $\pm$ 0,24 *	32,26 $\pm$ 0,47 *
pH	6,47 $\pm$ 0,21	5,89 $\pm$ 0,26 *	5,92 $\pm$ 0,04 *	5,93 $\pm$ 0,11 *	5,93 $\pm$ 0,07 *	5,90 $\pm$ 0,07 *
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	4,26 $\pm$ 0,84	6,88 $\pm$ 2,46	6,38 $\pm$ 3,23	6,42 $\pm$ 2,65	5,92 $\pm$ 2,48	7,12 $\pm$ 2,05
amônia total (mg L^{-1})	0,05 $\pm$ 0,01	2,64 $\pm$ 1,06 *	2,45 $\pm$ 0,31 *	2,45 $\pm$ 0,76 *	2,43 $\pm$ 0,25 *	2,39 $\pm$ 0,17 *

2502 Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco representa uma diferença significativa
 2503 entre os tratamentos e o grupo basal ($P < 0,05$).

2504

2505 *Parâmetros sanguíneos*

2506 Não houve interação entre os tratamentos (concentrações de EOLO) e os tempos
 2507 de coleta para glicose, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, HCM e leucócitos ($P >$
 2508 0,05) (Tabela 2). Em relação aos tratamentos, observa-se que pacus transportados com 20
 2509 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO tiveram valores de glicose significativamente menores do que o grupo
 2510 controle e demais concentrações avaliadas ($P < 0,05$). Em relação ao período de coleta,
 2511 os maiores valores de glicose, VCM, leucócitos e trombócitos foram observados logo
 2512 após o transporte, com redução 48 h pós-transporte. Em contrapartida, os maiores valores
 2513 de hemoglobina, CHCM e HCM foram observados logo após o transporte e 48 h pós-
 2514 transporte, com menores valores observados 24 h pós-transporte.

2515 Os eritrócitos e trombócitos foram afetados pelo tratamento, tempo de coleta e sua
 2516 interação ($P < 0,05$) (Tabela 3 e 4). Os maiores valores de eritrócitos observados foram
 2517 para pacus transportados com 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em comparação ao grupo controle,
 2518 imediatamente após o transporte ($P < 0,05$); sendo as demais concentrações semelhantes
 2519 entre si. No entanto, os níveis de eritrócitos retornaram ao normal em todos as
 2520 concentrações EOLO dentro de 24 h pós-transporte. Ao comparar dentro de cada
 2521 tratamento, os maiores níveis de eritrócitos foram encontrados 48 h pós-transporte e
 2522 variou de $1,52 \pm 0,03$ a $1,55 \pm 0,04$ ($\times 10^{-6}$). Já, os maiores valores de trombócitos

observados foram para pacus transportados com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO em comparação ao grupo controle, imediatamente após o transporte ($P < 0,05$); sendo diferente ainda do grupo basal (antes do transporte). No entanto, os níveis de trombócitos retornaram ao normal em todas as concentrações de EOLO 48 h pós-transporte. Ao comparar dentro de cada tratamento, os maiores níveis de trombócitos foram encontrados 48 h pós-transporte e variou de $1,23 \pm 0,09$ a $1,74 \pm 0,59$ ($\times 10^{-3}$).

Histopatologia de brânquias

Na avaliação das médias das alterações morfológicas das brânquias, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para o IAH, entre os diferentes tempos de coleta e as concentrações de EOLO (Tabela 5). Em todos os grupos, identificaram-se alterações não patológicas de leves a moderadas nas brânquias (Hiperplasia e fusão do epitélio lamelar, dilatação capilar, deslocamento do epitélio lamelar, aneurisma lamelar e ruptura epitelial com hemorragia) (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Constituintes residuais do EOLO

As concentrações de EOLO utilizadas no transporte de pacus foram bem reduzidas, resultando em teores de compostos residuais no músculo que, na maioria dos casos, ficaram abaixo dos limites detectáveis. Contudo, o composto principal do EOLO, o carvacrol, foi observado nas amostras apresentando efeito quadrático entre os tratamentos logo após o transporte com maior concentração do carvacrol para o tratamento de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO (Figura 4.). Como a figura 4 ilustra pacus transportados com 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO na água apresentaram baixíssimos teores de carvacrol, variando entre 0,58 e 0,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ imediatamente após o transporte, que não foram detectados nos períodos subsequentes de coleta (24 e 48 h pós-transporte). Já, os pacus transportados com 10 e 15 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO apresentaram teores de carvacrol variando de 1,16 a 1,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ logo após o transporte, que não foram detectados nos períodos subsequentes de coleta. Por outro lado, pacus transportados com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO apresentaram teores de carvacrol no filé variando de 2,44 a 2,66 $\mu\text{g kg}^{-1}$ imediatamente após o transporte, e de 0,51 a 0,61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ após 24 h do fim do transporte, não sendo observado 48 h pós-transporte.

Tabela 2. Valores (média $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros sanguíneos em três tempos de coleta após 4 h de transporte de *Piaractus mesopotamicus* submetidos à diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia organoides*

		Glicose (mg dL ⁻¹)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Eritrócitos (x 10 ⁻⁶)	VCM	CHCM	HCM	Leucócitos T. (x 10 ⁻³)	Trombócitos T. (x 10 ⁻³)
Tratamentos (EOLO)	0 μ L L ⁻¹	73,41 $\pm$ 46,22 ab	17,56 $\pm$ 7,90	11,22 $\pm$ 5,16	1,33 $\pm$ 0,34b	129,13 $\pm$ 58,63	67,87 $\pm$ 27,45	78,61 $\pm$ 35,38	9,95 $\pm$ 4,63 b	3,48 $\pm$ 2,00 c
	5 μ L L ⁻¹	86,47 $\pm$ 41,86 ab	19,33 $\pm$ 7,82	13,45 $\pm$ 6,14	1,49 $\pm$ 0,16a	142,04 $\pm$ 47,05	65,11 $\pm$ 32,84	89,57 $\pm$ 38,27	13,49 $\pm$ 6,03 ab	4,93 $\pm$ 3,41 c
	10 μ L L ⁻¹	70,94 $\pm$ 42,24 ab	19,20 $\pm$ 5,50	14,99 $\pm$ 6,03	1,42 $\pm$ 0,12ab	140,64 $\pm$ 44,28	82,65 $\pm$ 50,61	106,02 $\pm$ 33,39	14,02 $\pm$ 6,33 ab*	7,44 $\pm$ 4,16 bc
	15 μ L L ⁻¹	97,25 $\pm$ 48,21 a	21,44 $\pm$ 5,42	12,48 $\pm$ 6,48	1,41 $\pm$ 0,11ab	159,61 $\pm$ 37,20	68,00 $\pm$ 28,43	87,02 $\pm$ 43,96	12,15 $\pm$ 5,49 ab	9,87 $\pm$ 6,85 ab*
	20 μ L L ⁻¹	58,88 $\pm$ 28,29 b	19,29 $\pm$ 7,58	14,08 $\pm$ 11,55	1,41 $\pm$ 0,13ab	141,91 $\pm$ 51,92	67,57 $\pm$ 39,32	100,05 $\pm$ 43,96	15,68 $\pm$ 5,32 a*	12,40 $\pm$ 6,46 a*
Antes do transporte	0	84,33 $\pm$ 42,88	20,50 $\pm$ 7,97	11,28 $\pm$ 4,95	1,47 $\pm$ 0,07	139,83 $\pm$ 57,56	56,76 $\pm$ 15,49	76,96 $\pm$ 35,73	7,09 $\pm$ 2,22	2,57 $\pm$ 1,08
Tempos de coleta (h)	1	97,86 $\pm$ 48,02 a	18,57 $\pm$ 6,76	13,55 $\pm$ 3,84 a	1,37 $\pm$ 0,17 b	148,64 $\pm$ 38,31 a	75,83 $\pm$ 32,36 a	98,69 $\pm$ 20,45 a	15,41 $\pm$ 3,69 a	9,93 $\pm$ 5,13 a
	24	79,15 $\pm$ 39,14 ab	21,68 $\pm$ 8,27	9,91 $\pm$ 9,01 b	1,31 $\pm$ 0,24 b	165,28 $\pm$ 55,59 a	37,79 $\pm$ 12,33 b	61,10 $\pm$ 28,63 b	15,60 $\pm$ 5,23 a	10,10 $\pm$ 5,76 a
	48	55,59 $\pm$ 25,01 b	17,71 $\pm$ 4,94	16,05 $\pm$ 6,70 a	1,54 $\pm$ 0,05 a	114,58 $\pm$ 32,54 b	96,03 $\pm$ 44,10 a	104,63 $\pm$ 43,33 a	7,99 $\pm$ 4,65 b	3,15 $\pm$ 2,36 b
p-value Tratamentos (A)		0,042	0,597	0,256	<0,000001	0,260	0,665	0,363	0,00334	<0,000001
P-value Tempos (B)		0,0002	0,085	<0,000001	<0,000001	0,00062	<0,000001	0,00003	<0,000001	<0,000001
p-value da interação										
(A x B)		0,099	0,299	0,524	<0,000001	0,375	0,298	0,806	0,208	0,010
CV (%)		51,41	35,1	39,4	3,16	30,38	46,36	38,28	31,58	43,48

Médias seguidas por letras diferentes em uma coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05); CV = Coeficiente de variação. * indica diferença significativa em relação as variáveis antes do transporte (p<0,05).

2554 **Tabela 3** - Detalhamento da interação para eritrócitos ($\times 10^{-6}$) (média $\pm$ desvio padrão)
 2555 de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) em 1, 24 e 48 h após transporte com óleo
 2556 essencial de *Lippia origanoides* (EOLO)

Tempo de coleta (h)	Concentrações de EOLO				
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	5 $\mu\text{L L}^{-1}$	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	15 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$
1	1,37 $\pm$ 0,046bB	1,24 $\pm$ 0,026cC	1,28 $\pm$ 0,021bcC	1,24 $\pm$ 0,042cC	1,65 $\pm$ 0,023aA
24	1,27 $\pm$ 0,039bC	1,38 $\pm$ 0,047aB	1,40 $\pm$ 0,044aB	1,40 $\pm$ 0,051aB	1,28 $\pm$ 0,054bC
48	1,55 $\pm$ 0,044A	1,52 $\pm$ 0,034A	1,53 $\pm$ 0,044 A	1,54 $\pm$ 0,043A	1,53 $\pm$ 0,045B

2557 Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam
 2558 diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
 2559

2560 **Tabela 4** – Detalhamento da interação para trombócitos ($\times 10^{-3}$) (média $\pm$ desvio padrão)
 2561 de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) em 1, 24 e 48 h após transporte com óleo
 2562 essencial de *Lippia origanoides* (EOLO)

Tempos de coleta (h)	Concentrações de EOLO				
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	5 $\mu\text{L L}^{-1}$	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	15 $\mu\text{L L}^{-1}$	20 $\mu\text{L L}^{-1}$
1	5,06 $\pm$ 1,024b	5,95 $\pm$ 0,645b	6,79 $\pm$ 3,391bAB	15,26 $\pm$ 3,699aA	14,70 $\pm$ 1,390aA
24	3,89 $\pm$ 2,009d	4,81 $\pm$ 3,158bc	12,56 $\pm$ 2,605abA	16,46 $\pm$ 4,184aA	6,46 $\pm$ 5,023cdA
48	1,39 $\pm$ 0,358	1,74 $\pm$ 1,522	1,23 $\pm$ 0,098B	1,24 $\pm$ 0,443B	1,74 $\pm$ 0,598B

2563 Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam
 2564 diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
 2565

2566 **Tabela 5** - Índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de juvenis de
 2567 *Piaractus mesopotamicus* (pacu) transportados com óleo essencial de *Lippia origanoides*
 2568 (EOLO)

Tratamentos (EOLO)	IAH	
	0 $\mu\text{L L}^{-1}$	17,42 $\pm$ 2,11
	5 $\mu\text{L L}^{-1}$	20,36 $\pm$ 6,21
	10 $\mu\text{L L}^{-1}$	19,57 $\pm$ 3,74
	15 $\mu\text{L L}^{-1}$	18,73 $\pm$ 6,56
	20 $\mu\text{L L}^{-1}$	18,47 $\pm$ 6,12
Antes do transporte (basal)	0	17,40 $\pm$ 3,81
Tempos de coleta (h)	1	20,83 $\pm$ 4,58
	24	18,57 $\pm$ 6,65
	48	17,35 $\pm$ 3,82
p-value Tratamentos (A)		0,660
P-value Tempos (B)		0,101
p-value da interação (A x B)		0,903
CV (%)		25,84

2569 Não houve diferença significativa entre os tratamentos e os tempos de coleta ($P > 0,05$); CV – Coeficiente
 2570 de variação.

2571

2572

2573

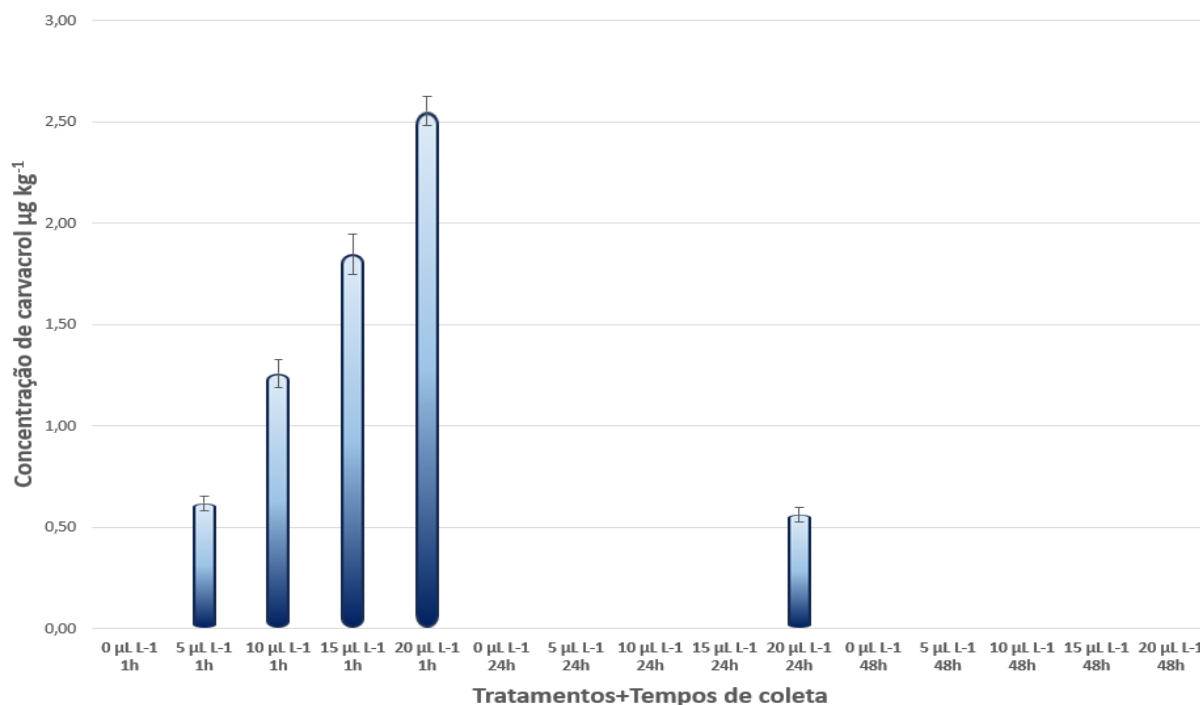


Figura 3. Concentração de carvacrol $\mu\text{g kg}^{-1}$ no músculo de juvenis de pacus transportados com água contendo óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Discussão

O óleo essencial de *Lippia origanoides* utilizado no trabalho apresentou o composto carvacrol um fenol monoterpênóide (49,7%) em maior concentração em sua composição química, correspondendo ao quimiotipo carvacrol já identificado na *Lippia origanoides* (Stashenko et al., 2010), então é possível classifica-lo como o principal constituinte, uma vez que, na classificação dos compostos dos óleos essenciais os principais são aqueles com concentrações entre 20 e 95%, os demais compostos observados em concentrações mais elevadas foram o p-cimeno (13,3%) e timol (9,9%) classificados como constituintes secundários (1-20%) (Bakkali et al., 2008). Em trabalhos anteriores, já foi investigada a atividade sedativa e imunoestimulante do EOLO para peixes, com o carvacrol identificado como constituinte principal (Becker et al., 2018; Addam et al., 2019; da Silva et al., 2019). Então, a possível atividade sedativa observada em juvenis de pacu no presente estudo após o transporte pode ser atribuída ao constituinte carvacrol do óleo essencial de *L. origanoides*.

No uso de substâncias sedativas naturais durante o manejo e transporte de peixes, é crucial considerar a depleção residual dos componentes, devido a possibilidade desses compostos deixarem resíduos nos diferentes tecidos dos peixes, uma vez que, sua acumulação pode afetar as características organolépticas da carne, com possibilidade de

prejudicar o consumo e saúde dos consumidores. Portanto, a análise da depleção residual é importante (Meinertz et al., 1996; Guenette et al., 2007). Na aplicação de diversos compostos em espécies destinadas a produção de alimentos, deve ser determinado o limite máximo de resíduos (LMR), que é a concentração máxima de resíduo de uma determinada substância legalmente permitida nos alimentos (EMA, 2024).

Para o carvacrol, já existem normativas que determinam a ingestão dietética máxima recomendada para a população, derivada da pesquisa da comissão da União Europeia. (2019), foi determinado um máximo de exposição alimentar média não superior a 0,03 mg/kg ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) de peso corporal para a maioria dos grupos populacionais. No presente estudo a concentração residual do carvacrol foi diferente entre os tratamentos ($p < 0,05$) logo após o transporte apresentando efeito quadrático com o valor residual mínimo de $0,58 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a concentração de $5 \mu\text{L L}^{-1}$ e de máximo de $2,66 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a concentração de $20 \mu\text{L L}^{-1}$ logo após o transporte, ou seja, antes do período de depuração, o valor se encontrava abaixo do limite de utilização estabelecido demonstrando a segurança de utilização do EOLO.

A depleção residual dos componentes dos óleos essenciais já foi observada previamente no pacu, na pesquisa de Ventura et al. (2021) que avaliaram a depleção residual do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, e de forma semelhante a atual pesquisa, onde observaram a redução de 63,21% e 87,76% dos principais componentes do óleo essencial metil chavicol e linalol respectivamente, no tecido muscular dos peixes após 24 horas da exposição ao óleo essencial (300 mg L^{-1}), demonstrando o potencial de depleção dos componentes do músculo dos pacus. A depleção de componentes de óleos essenciais também já foram avaliadas em diferentes espécies como, o *Ramdia quelen* submetido a banho de imersão com água contendo S-(+)-linalol (153 mg L^{-1}) com avaliação da concentração residual do componente em diferentes tempos, foi observado redução significativa da concentração do S-(+)-linalol após 12 horas e após 24 horas não foi observado traços do componente (Bianchini et al. 2020). Para *Oreochromis niloticus* transportados por duas horas com água contendo óleo essencial de *Ocimum basilicum*, foi observada concentração residual do metil chavicol no músculo logo após o transporte ($20,52 \pm 2,05 \mu\text{g kg}^{-1}$) composto majoritário na composição centesimal do óleo essencial, no entanto, não foi possível identificar a presença dos demais componentes do óleo essencial (Ventura et al. 2020), observação semelhante a encontrada no atual trabalho.

Fatores como glicose também podem influenciar na maior taxa de depleção residual uma vez que pode indicar maior atividade do peixe quando exposto ao estresse

(Evans e Claiborne. 2006), no entanto foi observada incremento da glicose para o tratamento de 15 em relação ao de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO sem diferença entre os demais tratamentos, que não foi observada na comparação da concentração residual. Então a diferença observada pode ser atribuída ao incremento das concentrações do EOLO dos tratamentos.

Mesmo que abaixo do limite de utilização ainda deve ser ressaltada a importância de um período de eliminação de resíduos, garantindo o consumo seguro da carne (Botrel et al., 2017). Estudos indicam que o tempo necessário para a eliminação de componentes dos óleos essenciais varia entre 24 e 48 horas após a exposição (Botrel et al. 2017; Ventura et al., 2019), que corrobora com o observado no presente estudo.

O uso de fitoterápicos naturais antes e durante o transporte de peixes pode recomendado na piscicultura, pois auxilia na diminuição do metabolismo dos animais, o que reduz o consumo de oxigênio e a produção de amônia (Harmon, 2009; Sampaio e Freire, 2016). No estudo atual, foi observado um aumento na temperatura após o transporte em relação a água antes do transporte, o que já era esperado devido à temperatura ambiente de cerca de 33 °C durante o procedimento, aliado ao fato de que as embalagens não possuíam isolamento térmico. Essas variações na temperatura após o transporte em relação a temperatura da água antes do transporte já foram observadas anteriormente, como nos trabalhos de Teixeira et al. (2018) que avaliaram o transporte de tilápias do Nilo com água contendo o óleo essencial de *Aloysia triphylla* e Oliveira et al. (2024) que avaliaram os efeitos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* incluso na água do transporte do *Brycon hilari*. Essa elevação de temperatura pode aumentar o consumo de oxigênio e a concentração de amônia total da água após o transporte, uma vez que, a temperatura influencia na atividade e metabolismo dos peixes (Becker et al. 2012; Oliveira et al., 2024).

As variações dos parâmetros de qualidade da água não foram diferentes entre os tratamentos, ou seja, as flutuações das variáveis avaliadas no transporte não foram resultantes da presença do EOLO na água do transporte, possibilitando aferir que as alterações podem ter sido ocasionadas pelo consumo e atividade metabólicos dos peixes, condições do transporte e influência do ambiente (Colt et al. 2011; Sampaio e Freire, 2016). Além disso, no presente estudo, os pacus chegaram ao destino com 100% de sobrevivência; fato também observado por Silva et al. (2019), ao anestesiarem tambaquis com óleo essencial de *L. origianoides*.

No atual estudo, os maiores valores de glicose foram observados imediatamente

após o transporte para pacus transportados com 15 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO. Peixes em situações estressantes liberam catecolaminas e corticosteroides que ativam os processos de gliconeogênese e glicogenólise, que mobilizam e aumentam a glicose na corrente sanguínea para o corpo escapar ou se ajustar às novas condições fisiológicas impostas pelo ambiente (Pankhurst, 2011; Jerez-Cepa e Ruiz-Jarabo, 2021). No entanto, a hiperglicemia foi observada 1 e 24 h pós transporte e pode estar relacionada ao aumento da agitação ocasionada pelo procedimento. Entretanto, os valores de glicose tendem a retornar aos níveis normais (Boaventura et al. 2020; Ferreira et al. 2022b), como observado neste estudo após 48 h do fim do transporte. Porém, a concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de EOLO foi capaz de reduzir a glicose após o procedimento, indicando uma possível redução do estresse ocasionado pelo transporte de peixes vivos.

Na avaliação da saúde dos peixes, é importante mensurar os parâmetros hematológicos, pois, são considerados importantes marcadores de acompanhamento do bem-estar e saúde, pois, alterações em seus valores podem ocorrer quando os peixes são submetidos a situações de estresse (Tavares-Dias et al. 2008). Auxiliando na descrição de processos anêmicos e de alterações homeostáticas (Tavares-Dias et al. 2008). O processo de estresse pode ocasionar a elevação do hematócrito pelo aumento no número de eritrócitos circulante, resultando também, no aumento da hemoglobina. Dessa forma, a mensuração e avaliação dos parâmetros hematológicos na atual pesquisa podem evidenciar (Oba et al. 2009)

No atual estudo a maioria dos parâmetros hematológicos, como hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM e CHM, apresentaram valores próximos aos de referência para a espécie (Tavares-Dias e Mariano, 2015). Contudo, foi notada uma elevação no número total de eritrócitos nos peixes transportados com água contendo EOLO, especialmente na concentração de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO, comparado ao tratamento sem óleo essencial (controle). Além disso, observou-se um aumento no número de eritrócitos em todos os tratamentos após 48 horas do transporte, o que pode estar relacionado à hemodiluição causada por disfunção no sistema de osmorregulação dos juvenis de pacu (Houston et al., 1996). Esse fenômeno pode ser induzido pelo estresse, seguido de um retorno à homeostase do organismo (Becker et al., 2016), geralmente associado ao aumento do fluxo sanguíneo branquial (Becker et al., 2012).

No entanto, Oliveira et al. (2018), ao exporem juvenis de tambaqui a diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides* por 96 horas, não observaram alterações na contagem de eritrócitos. Já Ventura et al. (2020) avaliaram o efeito do óleo

essencial de *Ocimum basilicum* no transporte de tilápias-do-Nilo e, diferente deste estudo, encontraram uma redução no número total de eritrócitos nos peixes tratados com o óleo, sem alterações em hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM e HCM. De forma semelhante, Oliveira et al. (2024) analisaram o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* em juvenis de *Brycon hilarii* e não detectaram alterações nas variáveis hematológicas.

Alterações no número de eritrócitos podem representar uma tentativa de adaptação ao estresse do transporte. A comparação das variáveis nos diferentes tempos pós-transporte sugere que os valores superiores de hemoglobina, eritrócitos, CHCM e HCM observados após 48 horas podem indicar o restabelecimento da homeostase e da osmorregulação (Houston et al., 1996). A elevação do VCM observada 1 e 24 horas após o transporte pode estar associada às menores concentrações de hemoglobina e eritrócitos totais (Soares et al., 2017).

Em relação aos leucócitos e trombócitos, foram observadas concentrações maiores nos tratamentos com EOLO, principalmente no tratamento com 20 $\mu\text{L L}^{-1}$, que também diferiu em relação aos peixes não transportados. Nos tratamentos com 15 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{L L}^{-1}$, houve uma interação positiva na quantidade de trombócitos 1 e 24 horas após o transporte, comparados aos tratamentos com 0 $\mu\text{L L}^{-1}$, 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{L L}^{-1}$. Esse aumento pode estar relacionado ao efeito imunoestimulante e mitigador de estresse do EOLO, que influencia positivamente a resposta do peixe em situações adversas, uma característica típica dos óleos essenciais (Dairiki et al., 2013). Esse aumento inicial das células imunológicas pode ser uma resposta ao estresse, seguida de uma possível queda, indicando o enfraquecimento do sistema imune (Vosylienė, 1999), como observado após 48 horas do transporte.

No presente estudo, foram encontradas alterações leves a moderadas em todos os tratamentos e tempos de coleta avaliados ($p > 0,05$), possivelmente causadas pela presença de parasitas, condições ambientais ou pelo manejo de transporte (Soares et al., 2017). Cabe destacar que, em estudos anteriores, o EOLO não demonstrou efeito citotóxico em células de diferentes espécies animais (Caballero Gallardo et al., 2012; Escobar et al., 2010; Sarrazin et al., 2015). No entanto, Soares et al. (2017) observaram lesões residuais nas brânquias de *Colossoma macropomum* expostos a concentrações de 40 mg L^{-1} de EOLO. Lesões branquiais também foram reportadas em peixes da mesma espécie, expostos a concentrações de 100 e 150 mg L^{-1} de óleo essencial de *Lippia alba* (Soares et al., 2016).

Diante os resultados apresentados do nosso estudo, pode-se inferir que o EOLO

foi segura e eficaz como sedativo durante o transporte de juvenis de pacus em sacos plásticos, sendo capaz de mitigar os efeitos do estresse ocasionado pelo transporte.

Conclusões

O uso de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ EOLO na água de transporte de 4 horas é promissor para garantir a sobrevivência e o bem-estar de juvenis de pacus (pesando 54 g), mostrando-se seguro e eficaz. Sendo, capaz de manter níveis de glicose baixos durante o transporte. Ademais, o EOLO não provocou lesões graves às brânquias dos juvenis de pacus. A concentração residual de carvacrol, o principal composto de EOLO no filé foi mínima em 24 h pós-transporte.

Agradecimentos

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil Código 01) pelas bolsas de doutorado e pós-doutorado dos discentes envolvidos na pesquisa. E a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-Brasil nº 71/049.087/2021) pelo apoio para o projeto de pesquisa.

Referências

- Almeida RGS, Martins MA, Oliveira FC, Santo FE, Calves GS, Pilarski F, Chagas EC, Fernandes CE, Martins ML, Campos CM (2021) Dietary supplementation of ginger (*Zingiber officinale*) essential oil exhibits positive immunomodulatory effects on the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* without negative effects on fish liver histomorphometry. Lat Am J Aquat Res 49:595-607. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue4-fulltext-2667>.
- Aydın B, Barbas LAL (2020) Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. Aquaculture 520:734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>.
- Bandeira Junior G, Souza CDF, Baldissera MD, Descovi SN, Silveira BPD, Tasca C, Mourão RHV, de Vargas APC, Baldisserotto B (2019) Plant essential oils against bacteria isolated from fish: an in vitro screening and in vivo efficacy of *Lippia origanoides*. Ciência Rural, 49: e20190064. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190064>
- Becker AG, Parodi TV, Heldwein CG, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2012) Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. Fish Physiology Biochemistry 38: 789-796. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4>
- Becker AG, Parodi TV, Zeppenfeld CC, Salbego J, Cunha MA, Heldwein CG, Loro VL, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2016) Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. Fish Physiol. Biochem 42: 73-81. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0118-x>
- Becker AJ, Fogliarini CDO, Souza CDF, Becker AG, Mourão RHV, Silva LVFD, Baldisserotto B (2018) Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: a comparative approach between different essential oils. Revista Brasileira de Zootecnia 47: e20170185. <https://doi.org/10.1590/rbz4720170185>
- Bianchini AE, Rodrigues P, Barbosa LB, Junior GB, de Freitas Souza C, Heinzmann B

- 2783 M, Baldisserotto B (2020) Tissue distribution and elimination of S-(+)-linalool in silver
 2784 catfish (*Rhamdia quelen*). Aquaculture 529: 735637.
 2785 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735637>
 2786
- 2787 Brandão FR, Souza DCM, Sebastião FA, Chaves FCM, Bizzo HR, O'Sullivan FL,
 2788 Chagas EC (2021) Essential oils as anaesthetics and sedatives in native Brazilian fish,
 2789 with a special emphasis on *Colossoma macropomum*: A review. Aquaculture
 2790 Research 53:767-781. <https://doi.org/10.1111/are.15650>
 2791
- 2792 Boaventura TP, Souza CF, Ferreira AL, Favero GC, Baldissera MD, Heinzmann BM,
 2793 Baldisserotto B, Luz RK (2021) The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil during
 2794 the transport of *Lophiosilurus alexandri*: Water quality, hematology, blood biochemistry
 2795 and oxidative stress. Aquaculture 531: 735964.
 2796 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735964>
 2797
- 2798 Botrel BMC, Abreu DCP, Bazana MJF, Rosa PV, Saczk AA (2019) Development,
 2799 Optimization, and Validation of the HS-SPME/GC-MS Method for the Residual
 2800 Determination of Menthol in Fish. Food Anal Methods 12: 1390–1398.
 2801 <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01467-x>
 2802
- 2803 Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Stashenko EE (2012) Repellency and toxicity of
 2804 essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides*
 2805 cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. J. Stored Prod Res 50: 62–65.
 2806 <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.05.002>
 2807
- 2808 Carson FL, Cappellano CH (2009) Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3rd
 2809 Edition, American Society for Clinical Pathology Press, Chicago.
 2810
- 2811 Collier HB (1944) Standardization of blood haemoglobin determinations. Can Med Assoc
 2812 50:550-552.
 2813
- 2814 Comissão da União Europeia, 'Technical Dossier for submission of an application in EU'
 2815 COM (2019) Deliverable 6.7, Ref. Ares(2019)7933242.
 2816 [https://ec.europa.eu/research/participants/documents/downloadPublic?documentIds=08](https://ec.europa.eu/research/participants/documents/downloadPublic?documentIds=080166e5cabaaf64&appId=PPGMS)
 2817 [0166e5cabaaf64&appId=PPGMS](https://ec.europa.eu/research/participants/documents/downloadPublic?documentIds=080166e5cabaaf64&appId=PPGMS); Accessed (10.10.2024)

- 2818
- 2819 Dairiki JK, Majolo C, Chagas EC, Chaves FCM, Oliveira MR Moraes IS (2013)
- 2820 Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. Embrapa
- 2821 Amazônia Ocidental 8p.
- 2822 <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100643/1/Circ-Tec-42.pdf>
- 2823 (accessed 06.06.2024)
- 2824
- 2825 Dawood MAO, El Basuini MF, Yilmaz S, Abdel-Latif HMR, Alagawany M, Kari ZA,
- 2826 Abdul Razab MKA, Hamid NKA, Moonmanee T, Van Doan H (2022) Exploring the
- 2827 Roles of Dietary Herbal Essential Oils in Aquaculture: A Review. *Animals* 12:823.
- 2828 <https://doi.org/10.3390/ani12070823>
- 2829
- 2830 Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E (2010) Chemical
- 2831 composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their
- 2832 major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 184–190.
- 2833 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200013>
- 2834
- 2835 European Medicines Agency (EMA). Guideline on determination of the need for an MRL
- 2836 evaluation for chemical-unlike biological substances, 2024.
- 2837 [https://www.ema.europa.eu/en/need-maximum-residue-limit-mrl-evaluation-biological-](https://www.ema.europa.eu/en/need-maximum-residue-limit-mrl-evaluation-biological-substances-scientific-guideline)
- 2838 [substances-scientific-guideline](https://www.ema.europa.eu/en/need-maximum-residue-limit-mrl-evaluation-biological-substances-scientific-guideline) (accessed 10.11.2024)
- 2839
- 2840 Evans DH, Claiborne JB (2005) *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton pp.
- 2841 319-342.
- 2842
- 2843 Ferreira AL, de Souza e Silva W, Neves LDC, Ferreira NS, Takata R, Luz RK (2020)
- 2844 Benzocaine and menthol as anesthetics for the African cichlid *Aulonocara*
- 2845 *nyassae*. *Aquaculture International* 28: 1837-1846. [https://doi.org/10.1007/s10499-020-](https://doi.org/10.1007/s10499-020-00561-w)
- 2846 00561-w
- 2847
- 2848 Ferreira AL, Favero GC, Boaventura TP, de Freitas Souza C, Ferreira NS, Descovi SN,
- 2849 Baldisserotto B, Heinzmann BM, Luz RK (2021) Essential oil of *Ocimum gratissimum*
- 2850 (Linnaeus, 1753): efficacy for anesthesia and transport of *Oreochromis niloticus*. *Fish*
- 2851 *Physiology and Biochemistry*, 47: 135-152. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00900-x>
- 2852
- 2853 Ferreira AL, de Souza e Silva W, da Silva HNP, de Freitas Milarch C, Palheta GDA,

- 2854 Heinzmann BM, Pinheiro CG, Baldisserotto B, Favero GC, Luz RK (2024) Oxidative
 2855 responses in small juveniles of *Colossoma macropomum* anesthetized and sedated with
 2856 *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Fish Physiol Biochem 50: 1-21.
 2857 <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01350-5>.
 2858
- 2859 Guenette AS, Uhland FC, Hélie P, Beaudry F, Vachon P (2007) Pharmacokinetics of
 2860 eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 266: 262- 265.
 2861 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>
 2862
- 2863 Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosious E (1971) Reproducibility in the hematology
 2864 laboratory: the microhematocrit determination. Am J Clin Pathol 56:35-39.
 2865 <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
 2866
- 2867 Gomułka P, Dągowski J, Własow T, Szczepkowski M, Czerniak E, Ziomek E,
 2868 Szczerbowski A, Luczynski M, Szkudlarek M 2015 Haematological and biochemical
 2869 blood profile in Russian sturgeon following propofol and eugenol anaesthesia. Turkish
 2870 Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 15: 13-17. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_1_02)
 2871 [v15_1_02](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_1_02)
 2872
- 2873 Harmon TS (2009) Methods for reducing stressors and maintaining water quality
 2874 associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. Reviews in Aquaculture
 2875 1: 58-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>.
 2876
- 2877 Houston AH, Dobric N, Kahurananga R (1996) The nature of hematological response in
 2878 fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to stimulated winter, spring
 2879 and summer conditions. Fish Physiol. Biochem 15: 339-347. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1007/BF02112361)
 2880 [10.1007/BF02112361](https://doi.org/10.1007/BF02112361)
 2881
- 2882 Imbiriba EP, Lourenço Júnior JB, Moura Carvalho LOD (2000) Parâmetros ambientais e
 2883 qualidade de água na piscicultura. Embrapa 8: 1-4.
 2884
- 2885 Jerez-Cepa I, Ruiz-Jarabo I (2021) Physiology: an importante tool to assess the welfare
 2886 of aquatic animals. Biology 10:61. <https://doi.org/10.3390/biology10010061>
 2887

- 2888 Keene JI, Noakes DIG, Moccia RD, Soto GC (1998) The efficacy of clove oil as an
 2889 anesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac Res 29:89-101.
 2890 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>
 2891
- 2892 Liu Y, Zhou XW, Ding HT, Dong XJ, Zhang JJ, Zheng YC, Chen XN, Cheng HL, Ding
 2893 ZJ, Xu JH (2022) Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on sedation and
 2894 responses of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) subjected to simulated
 2895 transportation stress. Aquaculture 549: 737789.
 2896 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737789>
 2897
- 2898 Martins ML, Cardoso L, Furtado W, Tancredo KR, Lehmann NB, Figueiredo AB,
 2899 Steckert LD, Addam K, Pádua SB, Ferreira TH (2018) Histopathology guide for
 2900 freshwater fish. Editora UFSC, Florianopolis.
 2901
- 2902 Meinertz JR, Stehly GR, Gingerich WH (1996) Pharmacokinetics of benzocaine in
 2903 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. Aquaculture 148: 39-48.
 2904 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01406-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01406-8)
 2905
- 2906 Moreira AP, Oliveira FC, Ferreira AL, de Almeida PR, Costa DC, Cardoso CAL, Chaves
 2907 FCM, Chagas EC, de Campos CM (2024) Efficacy of essential oil from ginger (*Zingiber*
 2908 *officinale*) for anesthesia and transport sedation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fish
 2909 Physiology and Biochemistry 50: 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01346-1>
 2910
- 2911 Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia:
 2912 considerations, methods, and types of drugs. ILAR J 50:343-360.
 2913 <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>.
 2914
- 2915 Oba ET, Mariano WS, Santos LRB (2009) Estresse em peixes cultivados: agravantes e
 2916 atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares -Dias, M. (Org.). Manejo e sanidade de
 2917 peixes em cultivo. Macapá: Embrapa, Amapá 226-247p.
 2918
- 2919 Oliveira DR, Leitaog GG, Bizzo HR, Alviano DS, Alviano CS, Leitão SG (2007) Chemical
 2920 and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* HBK. Food
 2921 Chemistry 101: 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>
 2922

- de Oliveira SRN, de Oliveira MAS, Brandao FR, Majolo C, Chaves FCM, Chagas EC (2018) Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. Boletim do Instituto de Pesca 44: 1-7. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.346>
- Oliveira FC, Moreira AP, Ferreira AL, Costa DC, Cardoso CAL, Chaves FCM, Campos CM (2024a) *Ocimum gratissimum* essential oil in the transport water of *Brycon hilarii*: implications at water quality, blood parameters and residues in tissue and plasma. Brazilian Journal of Biology 84: e280240. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.280240>
- Oliveira MIB, Brandão FR, Tavares-Dias M, Barbosa BCN, Rocha MJS, Matos LV, Souza DCM, Majolo C, Oliveira MR, Chaves FCM, Chagas EC (2024b) Essential oils of *Ocimum gratissimum*, *Lippia grata* and *Lippia origanoides* are effective in the control of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. Aquaculture 578: 740043. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740043>
- Pankhurst NW (2011) The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. Gen. Comp. Endocrinol 170: 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>
- Poleksic V, Mitrović-Tutundžić V (1994) Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford, Reino Unido, pp 339-352.
- Sampaio FDF, Freire CA (2016) An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. Fish and Fisheries 17: 1055-1072. <http://dx.doi.org/10.1111/faf.12158>.
- Santos filho LGD, Reis RB, Souza ASQ, Canuto KM, Brito ES, Castro KN, Pereira AML, Diniz FM (2023) Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Lippia alba* and *Lippia origanoides*. An Acad Bras Cienc 95: e20220359. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202320220359>
- Sarrazin SL, Silva LA, Oliveira RB, Raposo JDA, Silva JKR, Salimena FRG, Maia JGS, Mourão RHV (2015) Antibacterial action against food-borne microorganisms and

- 2958 antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. Health Dis 14:
2959 145. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>
2960
- 2961 Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Triebkorn R (1997) The use of
2962 histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J Aquat
2963 Ecosyst Stress Recover 6: 75–86. <https://doi.org/10.1023/A:1008212000208>
2964
- 2965 Signor AA, Boscolo WR, Feiden A (2010) Proteína e energia na alimentação de pacus
2966 criados em tanques-rede. Revista Brasileira de Zootecnia 39: 2336-2341.
2967 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100004>
2968
- 2969 Silva HNPD, Carvalho BCFD, Maia JLDS, Becker AG, Baldisserotto B, Heinzmann B
2970 M, Mourão RHV, Silva LVFD (2019) Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia*
2971 *alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. Ciência Rural 49: 6.
2972 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181059>
2973
- 2974 Soares BV, Neves LR, Oliveira MSB, Chaves FCM, Dias MKR, Chagas EC, Tavares-
2975 Dias M (2016) Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites
2976 of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological
2977 effects. Aquaculture 452: 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
2978
- 2979 Soares BV, Cardoso ACF, Campos RR, Gonçalves BB, Santos GG, Chaves FCM, Chagas
2980 EC, Tavares-Dias M (2017) Antiparasitic, physiological and histological effects of the
2981 essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma*
2982 *macropomum*. Aquaculture 469: 72-78.
2983 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
2984
- 2985 Souza CDF, Baldissera MD, Baldisserotto B, Heizmann BM, Martos-Sitcha JA, Mancera
2986 JM (2019) Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish. Aquaculture: A Review.
2987 Front Physiol 10: 454552. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
2988
- 2989 Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA (2010) *Lippia origanoides* chemotype
2990 differentiation based on essential oil GC/MS and principal component analysis. Journal
2991 of Separation Science 33: 93-103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>

2992

2993 Tavares-Dias M, Moraes FR, Martins ML (2008) Hematological assessment in four
 2994 Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São
 2995 Paulo, Brazil. Boletim do Instituto de Pesca 34: 189-196.

2996

2997 Tavares-Dias M Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados.
 2998 In: Tavares-Dias M, Mariano, W dos S (Org.) (2015) Aquicultura no Brasil: novas
 2999 perspectivas. São Carlos: Pedro & João 11-44p.

3000

3001 Urbinati EC, Gonçalves FD, Takahashi LS (2013) **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**, In:
 3002 Baldisserotto B, Gomes LC (Eds.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. UFMS,
 3003 Santa Maria 8: 225-246p.

3004

3005 Ventura AS, Jerônimo GT, Oliveira SN, Araújo GAM, Cardoso CAL, Teodoro GC, Povh
 3006 JA (2020) Natural anesthetics in the transport of Nile tilapia: hematological and
 3007 biochemical responses and residual concentration in the fillet. Aquaculture 526:
 3008 735365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735365>

3009

3010 Ventura AS, Corrêa Filho RAC, Cardoso CAL, Stringhetta GR, de Oliveira Brasileiro L,
 3011 Ribeiro JS, Pereira AS, Jerônimo GT, Povh JA (2024) *Ocimum basilicum* essential oil in
 3012 pacu *Piaractus mesopotamicus*: anesthetic efficacy, distribution, and depletion in
 3013 different tissues. Veterinary Research Communications 48: 685-694.
 3014 <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10225-8>

3015

3016 Vosylienė MZ (1999) The effect of heavy metals on haematological indices of fish
 3017 (survey). Acta Zoologica Lituanica 9: 76-82.
 3018 <https://doi.org/10.1080/13921657.1999.10512290>