

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Adriane Erbice Bianchini

**FARMACOCINÉTICA DE S-(+)-LINALOL EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*)**

**Santa Maria, RS
2021**

Adriane Erbice Bianchini

**FARMACOCINÉTICA DE S-(+)-LINALOL EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**

Orientador: Dr. Bernardo Baldisserotto
Co-orientadora: Dra. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Bianchini, Adriane
Farmacocinética de S-(+)-linalol em jundiás (*Rhamdia quelen*) / Adriane Bianchini.- 2021.
74 p.; 30 cm

Orientador: Bernardo Baldisserotto
Coorientadora: Berta Maria Heinzmann
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Anestésicos 2. Depleção tecidual 3. Monoterpenoides
4. Peixes 5. Produtos naturais I. Baldisserotto, Bernardo II. Heinzmann, Berta Maria III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ADRIANE BIANCHINI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Adriane Erbice Bianchini


**FARMACOCINÉTICA DE S-(+)-LINALOL EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**

Aprovado em: 18 de junho de 2021



Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



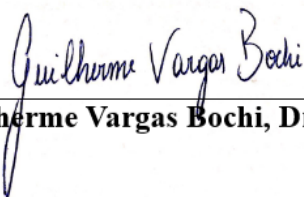
Helena Cristina da Silva de Assis, Dra. (UFPR)



Fabiana Pilarski, Dra. (UNESP)



Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao meu orientador Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto pela oportunidade concedida a mim em fazer parte do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), pela confiança, paciência e ensinamentos em mim depositados. Sou muito grata!

Aos colegas do LAFIPE pelas parcerias, acolhimento e amizade. Todos vocês contribuíram de alguma forma com meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Berta Maria Heinzmann pelo acolhimento no Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE) e pelos ensinamentos passados a mim nestes anos. Aos demais membros do LABEVE, minha gratidão pelo companheirismo e amizade!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

À Profa. Dra Maria Amália Pavanato e suas alunas por terem compartilhado comigo seu espaço de trabalho para a execução de etapas deste projeto.

As minhas queridas professoras Dra. Lenise de Lima Silva e Dra. Thaís Felli Kubiça pelos primeiros ensinamentos na área científica e por terem me incentivado a ingressar na Pós-Graduação.

Aos meus amigos Guerino Bandeira Junior, Isadora Aguirre Rosa, Patrícia Rodrigues e Quelen Iane Garlet, a amizade de vocês foi indispensável nesta caminhada.

Em especial aos meus maiores incentivadores, minha família e meu parceiro de vida Maurício Cardozo de Medeiros pelo apoio e compreensão de sempre. Amo vocês!

"Se enxerguei mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes"
(Isaac Newton)

RESUMO

FARMACOCINÉTICA DE S-(+)-LINALOL EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

AUTORA: ADRIANE ERBICE BIANCHINI
ORIENTADOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

O S-(+)-linalol é encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas como *Lippia alba*. Este fitoquímico teve sua atividade sedativa/anestésica elucidada em *Rhamdia quelen*, conhecido popularmente como jundiá. Assim, o S-(+)-linalol tornou-se uma opção como anestésico para aquicultura, porém seu perfil farmacocinético em peixes era desconhecido até o desenvolvimento desta tese. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi determinar o perfil farmacocinético de S-(+)-linalol em jundiás. O S-(+)-linalol foi quantificado em amostras de plasma, tecidos e água (da recuperação) através de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC). Para coleta do sangue e tecidos os peixes (n=6, para cada tempo de coleta) foram expostos em banho de imersão com S-(+)-linalol (153 mg/L ou 180 µL/L) por no máximo 30 min (0,5 h) e após transferidos para aquários sem o anestésico. As amostras de sangue e cérebro foram coletadas em diferentes tempos num intervalo de 0 a 4 horas e os demais tecidos (rim, fígado, brânquias e músculo) foram coletados no intervalo de 0 a 24 horas (a partir do início da exposição ao anestésico). Para determinar a excreção de S-(+)-linalol na água outro grupo de peixes (n= 6) foi anestesiado conforme descrito anteriormente e transferidos para aquários individuais por até 48 h. Amostras de água foram coletadas durante esse período e posteriormente analisadas por CG-DIC. Os resultados encontrados indicaram que o S-(+)-linalol é rapidamente absorvido e distribuído aos principais tecidos. As concentrações máximas (C_{máx}, tecidos µg/g e plasma µg/mL) ocorreram na magnitude: rim>plasma>cérebro>fígado>brânquias>músculo (143,15, 129,33, 113,92, 110,03, 54,49 e 20,76, respectivamente) em 0,5 h (T_{máx}) com exceção do cérebro (0,33 h). A eliminação de S-(+)-linalol ocorreu de forma mais rápida no plasma, seguido pelo fígado, rins, brânquias, músculo e cérebro (T_{1/2β}: 1,36, 3,45, 6,30, 9,96, 11,04 e 57,27 h, respectivamente). Apesar da eliminação lenta no cérebro, todos os animais recuperaram-se da anestesia em 10 min. O músculo foi o segundo tecido com maior T_{1/2β}, porém as concentrações residuais após 12 horas de depuração foram menores que a ingestão diária aceitável (500 µg/kg pc) determinada para o linalol (considerando uma ingestão de 300 g de tecido por uma pessoa de 60 kg). As taxas de excreção de S-(+)-linalol na água após 0,5, 1, 2, 6 e 24 h de recuperação foram 85,10 ± 9,83, 52,45 ± 5,01, 22,67 ± 2,10, 5,62 ± 0,55 e 1,63 ± 0,05 mg/kg h, respectivamente. Cerca de 68% do total de S-(+)-linalol excretado ocorreu nas primeiras 2 h de recuperação e não foram encontrados metabólitos voláteis em concentrações quantificáveis pelo método utilizado. Por fim, os resultados desta pesquisa fornecem base científica para nortear uma futura aplicação de S-(+)-linalol como anestésico na aquicultura e, principalmente, trazem evidências que a anestesia (por um período prolongado) com S-(+)-linalol nesta espécie não ocasiona bioacumulação em concentrações potencialmente prejudiciais à saúde humana. Contudo, demais estudos farmacocinéticos e toxicológicos devem ser desenvolvidos para que este fitoquímico possa ser empregado com total segurança em espécies aquáticas destinadas à alimentação humana.

Palavras-chave: Anestésicos. Depleção tecidual. Monoterpenoides. Peixes. Produtos naturais.

ABSTRACT

PHARMACOKINETICS OF *S*-(+)-LINALOOL IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)

AUTHOR: ADRIANE ERBICE BIANCHINI
ADVISOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

S-(+)-linalool is found in essential oils of aromatic plants as *Lippia alba*. This phytochemical had its sedative/anesthetic activity elucidated in *Rhamdia quelen*, popularly known as silver catfish. Thus, *S*-(+)-linalool has become an option as an anesthetic for aquaculture, but its pharmacokinetic profile was unknown until the development of this thesis. Therefore, the objective of this research was to determine the pharmacokinetic profile of *S*-(+)-linalool in silver catfish. *S*-(+)-linalool was quantified in plasma, tissue and water (from recovery) samples using gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). For blood and tissue collection, fish ($n = 6$, for each collection time) were exposed to an immersion bath with *S*-(+)-linalool (153 mg/L or 180 μ L/L) for a maximum of 30 min (0.5 h) and after were transferred to aquariums without the anesthetic. The blood and brain samples were collected at different times in an interval from 0 to 4 hours and the other tissues (kidney, liver, gills and muscle) were collected in the interval from 0 to 24 hours (from the beginning of exposure to the anesthetic). To determine *S*-(+)-linalool excretion in the water another fish group ($n = 6$) was anesthetized as previously described and transferred to individual aquariums for up to 48 h. Water samples were collected during this period and later analyzed by GC-FID. The results found indicated that *S*-(+)-linalool is rapidly absorbed and distributed to the main tissues. The maximum concentrations (C_{max} , tissues μ g/g and plasma μ g/mL) occurred in the magnitude: kidney>plasma>brain>liver>gills>muscle (143.15, 129.33, 113.92, 110.03, 54.49 and 20.76, respectively) in 0.5 h (T_{max}) with the exception of the brain (0.33 h). The *S*-(+)-linalool elimination occurs more quickly in the plasma, followed by the liver, kidneys, gills, muscle and brain ($T_{1/2\beta}$: 1.36, 3.45, 6.30, 9.96, 11.04 and 57.27 h, respectively). Despite the slow elimination in the brain, all animals recovered from anesthesia within 10 min. Muscle was the second tissue with the highest $T_{1/2\beta}$, however the residual concentrations after 12 hours of clearance were less than the acceptable daily intake (500 μ g/kg bw) determined for linalool (considering an intake of 300 g of tissue per a 60 kg person). The *S*-(+)-linalool excretion rates in water after 0.5, 1, 2, 6 and 24 h of recovery were 85.10 ± 9.83 , 52.45 ± 5.01 , 22.67 ± 2.10 , 5.62 ± 0.55 and 1.63 ± 0.05 mg/kg h, respectively. About 68% of the total *S*-(+)-linalool excreted occurred in the first 2 h of recovery, and no volatile metabolites were found at concentrations quantifiable by the method used. Finally, the results of this research provide a scientific basis to guide a future application of *S*-(+)-linalool as an anesthetic in aquaculture and, mainly, bring evidence that anesthesia (for a prolonged period) with *S*-(+)-linalool in this species does not cause bioaccumulation at concentrations potentially harmful to human health. However, further pharmacokinetic and toxicological studies must be developed so that this phytochemical can be used with total safety in aquatic species used for human consumption.

Keywords: Anesthetics. Fish. Monoterpenoids. Natural products. Tissue depletion.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 – Curva hipotética da concentração plasmática/sanguínea de um fármaco em função do tempo após administração por via extravascular25
- Figura 2 – Estrutura química de *S*-(+)-linalol (esquerda) e *R*-(-)-linalol (direita).....28

ARTIGO 1

- Figure 1 – Representative chromatograms of *S*-(+)-linalool in analytical curves samples in plasma (A) and the brain (B), of the plasma sample at 30 min (C) and of the brain sample at 20 min (D).....41
- Figure 2 – Analytical curves for quantification of *S*-(+)-linalool in plasma (A) and the brain (B). IS = internal standard; y = peak area ratio of *S*-(+)-linalool-to-IS; x = concentration ratio of *S*-(+)-linalool-to-IS (mg/mL).....41
- Figure 3 – *S*-(+)-linalool concentration versus time (hours) in plasma and the brain of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) (n = 6). (*) Indicates difference between plasma and brain samples at the same time. One-way ANOVA $p < .05$41

ARTIGO 2

- Figure 1 – *S*-(+)-Linalool concentration versus time (h) in tissues (kidney, liver, muscle and gills) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) (n = 6). Statistical differences were determined by one-way ANOVA post-hoc Tukey or Kruskal–Wallis post-hoc Dunn test ($p < 0.05$).46
- Figure 2 – *S*-(+)-linalool excretion in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) (n = 6)47

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Anestésicos aprovados para uso em espécies aquáticas.	16
Tabela 2 – Parâmetros de qualidade de água na aclimação de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) (média ± erro padrão).	32
Tabela 3 – Estágios de indução anestésica	33

ARTIGO 1

Table 1 – Pharmacokinetic parameters of <i>S</i> -(+)-linalool (153 mg/L) in the plasma and brain of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) after immersion bath.....	42
Table 2 – Percentage of animals (n = 6) at each stage of anesthesia during the sampling period.	42

ARTIGO 2

Table 1 – Validation of the analytical method in the different matrices.	46
Table 2 – <i>S</i> -(+)-Linalool concentration versus time (h) in tissues (kidney, liver, muscle and gills) of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) after immersion bath (153 mg/L). Time of anesthesia was up to 0.5 h; afterwards, fish were placed in anesthetic-free water for recovery..	47
Table 3 – Pharmacokinetic parameters of <i>S</i> -(+)-linalool (153 mg/L) in the tissues of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) after immersion bath.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral	12
1.1.2	Objetivos Específicos.....	12
1.2	JUSTIFICATIVA	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	ESPÉCIE EM ESTUDO: <i>Rhamdia quelen</i>	14
2.2	SEDATIVOS E ANESTÉSICOS NA AQUICULTURA	14
2.2.1	Regulamentação de sedativos e anestésicos utilizados na aquicultura	15
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS ISOLADOS COM ATIVIDADE SEDATIVA E ANESTÉSICAS EM ESPÉCIES AQUÁTICAS	18
2.4	FARMACOCINÉTICA	20
2.5	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	23
2.6	ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS COM ANESTÉSICOS EM PEIXES	26
2.7	LINALOL	28
2.7.1	Farmacocinética de linalol	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	ISOLAMENTO DE S-(+)-LINALOL	31
3.2	ANIMAIS	31
3.3	EXPERIMENTO I.....	32
3.3.1	Indução anestésica	32
3.3.2	Coleta de sangue e tecidos.....	33
3.4	EXPERIMENTO II: COLETA DE ÁGUA.....	34
3.5	EXTRAÇÃO DE S-(+)-LINALOL DAS AMOSTRAS.....	34
3.5.1	Plasma e cérebro.....	34
3.5.2	Demais tecidos (rim, fígado, brânquias e músculo).....	35
3.5.3	Água	35
3.5.4	Validação dos métodos de extração	35
3.6	QUANTIFICAÇÃO DE S-(+)-LINALOL	36
3.7	PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	37
4.1	ARTIGO 1	38
4.2	ARTIGO 2	44
5	DISCUSSÃO GERAL	50
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma fonte importante de proteína animal, com crescimento previsto de 32% até 2030 em relação à produção existente em 2018 (FAO, 2020). Em paralelo a este crescimento, a aplicação de medicamentos veterinários é muitas vezes necessária, seja de forma preventiva ou terapêutica, para melhorar a produtividade e/ou diminuir perdas por doenças (BALDISSEROTTO et al., 2017). Neste sentido, estudos de farmacologia aplicada à aquicultura são importantes para suprir essa demanda do setor. Dentre as classes de produtos/fármacos utilizados, os anestésicos são de grande valia, pois minimizam o estresse causado em situações rotineiras como o manuseio e transporte, além de possibilitarem procedimentos invasivos, contribuindo assim para o bem estar dos animais (LE et al., 2019; WEBER et al., 2009).

A disponibilidade e regulamentação do uso de anestésicos divergem entre os países, e quando disponível, apenas uma lista restrita de anestésicos é autorizada. O metanossulfonato de triclaína, um anestésico sintético, é o único anestésico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA para espécies aquáticas produtoras de alimento, com período de carência para o abate de 21 dias (FDA, 1997). Em países da Europa a benzocaína e o mesilato de triclaína também são utilizados na aquicultura (PRIBORSKY; VELISEK, 2018; ROSS; ROSS, 2008). O óleo de cravo e seus constituintes, eugenol e isoeugenol, foram os primeiros produtos naturais que surgiram como opções de anestésicos para aquicultura, e conseqüentemente, despertaram o interesse por outros extrativos vegetais com as mesmas propriedades farmacológicas (HOSEINI; MIRGHAED; YOUSEFI, 2018). Formulações anestésicas contendo eugenol e isoeugenol são comercializadas em alguns países, mas em contrapartida, o FDA não recomenda o uso destes produtos em espécies para consumo humano por não saber assegurar sua segurança alimentar (FDA, 2007).

A fim de preencher a lacuna existente na disponibilidade de anestésicos para a aquicultura, pesquisas com extrativos vegetais visam encontrar substâncias/produtos que além de possuírem eficácia farmacológica, sejam seguros aos animais, produtores, consumidores finais e ao meio ambiente. Os extrativos vegetais são fontes importantes de moléculas bioativas (BAKKALI et al., 2008), dentre eles, os óleos essenciais (OEs) e seus constituintes são extensivamente explorados para uso na aquicultura, não somente como anestésicos, mas também para outras finalidades como antimicrobianos, imunoestimulantes, antioxidantes e promotores de crescimento (BALDISSERA et al., 2018; CUNHA et al., 2018, 2019; SUTILI et al., 2018). Podemos destacar algumas espécies como *Lippia alba*, *Ocimum gratissimum*,

Aloysia triphylla, *Hesperozygis ringens* e *Cymbopogon flexuosus*, cujos OEs tiveram eficácia anestésica frente ao jundiá (*Rhamdia quelen*) (CUNHA et al., 2010; GRESSLER et al., 2014; SANTOS et al., 2017a; SILVA et al., 2012; TONI et al., 2014).

As ações farmacológicas dos OEs podem ocorrer pela ação isolada, sinérgica e/ou aditiva de seus constituintes, porém a presença de diferentes moléculas também pode acarretar em antagonismo entre elas e/ou efeitos indesejáveis que nem sempre conseguem ter sua origem estabelecida (BENOVIT et al., 2015; SIMÕES et al., 2017a). Neste sentido, estudos com substâncias isoladas podem excluir efeitos indesejáveis e fornecer respostas farmacológicas mais seletivas. Em jundiás estudos recentes descrevem a atividade anestésica de (+)-espatulenol (BENOVIT et al., 2015), (+)-dehidrofuquinona (GARLET et al., 2016), timol, carvacrol (BIANCHINI et al., 2017), terpinen-4-ol (SOUZA et al., 2018b) e linalol, incluindo o enantiômero *S*-(+)-linalol (HELDWEIN et al., 2014; SILVA et al., 2017), o qual é alvo de investigação neste estudo.

O *S*-(+)-linalol é o constituinte majoritário de OEs das folhas de *L. alba* cultivada em determinadas regiões como no sul do Brasil (HELDWEIN et al., 2012) e Índia (CHANOTIYA; YADAV, 2009), mas também pode ser encontrado nos OEs de outras espécies como as do gênero *Nepeta* (*N. cadmea*, *N. cataria*, *N. conferta*, *N. flavida* e *N. italica*) (ÖZEK et al., 2010) e *Aniba* (*A. rosaeodora* e *A. parviflora*) (BALDISSEROTTO et al., 2018). Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o *S*-(+)-linalol é um anestésico promissor, pois apresenta eficácia anestésica sem efeitos colaterais perceptíveis (BIANCHINI et al., 2017; HELDWEIN et al., 2012; SILVA et al., 2017). Além disso, o OE de *L. alba* quimiotipo *S*-(+)-linalol foi considerado seguro para anestesia de jundiás após a avaliação de diversos parâmetros fisiológicos (SOUZA et al., 2018a). Com base nestas evidências, acredita-se que o *S*-(+)-linalol tem grande potencial para uso na aquicultura como anestésico, no entanto, mais estudos devem ser elaborados, incluindo a elucidação de seu comportamento farmacocinético.

Estudos farmacocinéticos através da análise temporal da concentração no sangue/plasma fornecem informações necessárias sobre a absorção, distribuição, metabolização e excreção de substâncias/fármacos (STORPIRTIS et al., 2011). Também são importantes para estimar a depleção tecidual e, conseqüentemente, o período de carência de produtos veterinários utilizados em espécies destinadas ao consumo humano (ROSA, 2016). Neste caso é realizada a análise temporal da substância marcadora e/ou seus metabólitos nos tecidos comestíveis da(s) espécie(s), como por exemplo, no músculo de peixes (FANG et al., 2013; HUANG et al., 2017; MANSOUR et al., 2017). Esse conjunto de informações faz parte do processo de

regulamentação de novos medicamentos veterinários. Portanto, considerando que o *S*-(+)-linalol é uma molécula promissora como anestésico, dados sobre sua farmacocinética em uma espécie de peixe podem contribuir para o interesse da indústria por esta molécula, além de fornecer dados inéditos para a literatura científica. Neste contexto, esta tese contempla a investigação do perfil farmacocinético de *S*-(+)-linalol em jundiás.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil farmacocinético (absorção, distribuição tecidual e excreção) de *S*-(+)-linalol em jundiás através da análise temporal de sua concentração em amostras de plasma, tecidos, e água (aquários de recuperação).

1.1.2 Objetivos Específicos

— Padronizar as metodologias analíticas para extração e quantificação de *S*-(+)-linalol em amostras de plasma, tecidos (cérebro, músculo, rim, fígado e brânquias) e água por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC).

— Determinar a concentração temporal de *S*-(+)-linalol e/ou metabólitos voláteis em amostras de plasma e tecidos (cérebro, músculo, rim, fígado e brânquias) de jundiás durante o período de anestesia e recuperação.

— Determinar a concentração temporal de *S*-(+)-linalol e/ou metabólitos voláteis em amostras de água dos aquários durante o período de recuperação de jundiás.

— Determinar parâmetros farmacocinéticos de *S*-(+)-linalol: tempo de meia vida ($T_{1/2\beta}$), concentração máxima ($C_{máx}$), tempo máximo ($T_{máx}$) constante de eliminação (K_{el}) e áreas sob a curva (AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$) no plasma e tecidos.

— Determinar a taxa de excreção na água dos aquários durante a depuração de *S*-(+)-linalol.

1.2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da aquicultura cresce em paralelo à necessidade de intervenção farmacológica, a qual inclui medidas profiláticas com a inserção de sedativos e anestésicos. Contudo, a aquicultura mundial conta com uma lista restrita de anestésicos permitidos em espécies destinadas ao consumo, fato que justifica e reforça estudos nesta linha de pesquisa. Considerando os dados existentes na literatura, o *S-(+)-linalol* é um candidato com grande potencial como sedativo e anestésico em peixes. Além de sua eficácia, é um composto de origem natural, e com dados sobre toxicologia em humanos já conhecidos, sendo utilizado em muitos produtos alimentícios e de perfumaria. Além disso, é um composto que pode ser obtido de fontes renováveis uma vez que está presente em óleos essenciais de plantas aromáticas e não apresenta risco ao meio ambiente, pois é rapidamente degradado.

As informações existentes a respeito desta molécula facilitarão o pedido de aprovação e sua introdução no mercado de medicamentos veterinários. Contudo, o sucesso terapêutico de um fármaco e sua respectiva aprovação depende também de suas propriedades farmacocinéticas. Neste contexto o estudo da farmacocinética de *S-(+)-linalol* usando como modelo animal o jundiá dará suporte para uma possível aplicação deste composto como anestésico em peixes, e para a continuidade de pesquisas com o *S-(+)-linalol*. O conhecimento da depleção residual também é essencial em produtos/medicamentos veterinários usados em espécies destinadas ao consumo humano para assegurar um produto final livre de resíduos em concentrações prejudiciais à saúde humana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESPÉCIE EM ESTUDO: *Rhamdia quelen*

O *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), conhecido popularmente como jundiá, é uma espécie com distribuição neotropical podendo ser encontrada em todo território brasileiro (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). Esta espécie pertence à ordem Siluriformes, a qual contempla uma ampla variedade de espécies de água doce e salgada, conhecidas popularmente como bagres (BAUMGARTNER et al., 2012). O jundiá é bastante utilizado em nosso grupo de pesquisa como modelo animal para diversos estudos. Dentre eles podemos citar estudos de suplementação de dietas para o melhoramento de parâmetros zootécnicos e fisiológicos (LOPES et al., 2018b; SANTOS et al., 2017b; ZEPPEFELD et al., 2017), descoberta de novos antimicrobianos (CUNHA et al., 2018, 2019; SOUZA et al., 2017), estudos fisiopatológicos (BALDISSERA et al., 2019a, 2019b; BANDEIRA JUNIOR et al., 2018b; SOUZA et al., 2018c) e de toxicologia (BALDISSERA et al., 2020).

O jundiá também tem sido um modelo animal interessante para estudos de farmacologia, com destaque para trabalhos que visam o descobrimento de compostos com propriedades sedativas e anestésicas (BENOVIT et al., 2015; BIANCHINI et al., 2017; CUNHA et al., 2017; GARLET et al., 2016; LOPES et al., 2018a; SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2018b). Estudos recentes também comprovam que o jundiá é um modelo animal robusto e confiável para a avaliação da eficácia de moléculas com potencial antinociceptivo (RODRIGUES et al., 2019), e que atuam sobre o sistema nervoso central por meio do sistema GABAérgico (GARLET et al., 2019). Em suma, o jundiá, além de ser uma espécie de bagre com importância comercial, pode ser usado como modelo para pesquisas que são bem reconhecidas e aceitas na área científica.

2.2 SEDATIVOS E ANESTÉSICOS NA AQUICULTURA

O uso de sedativos/anestésicos é uma prática antiga na aquicultura. McFarland (1959) adaptou pela primeira vez os estágios de indução anestésica em peixes a partir do comportamento anestésico observado em mamíferos. Posteriormente, adaptações foram sendo realizadas a fim de aperfeiçoar o processo de indução anestésica (GOMES; CHAVES; BECKER, 2011; SCHOETTGER; JULIN, 1967, 1969; SMALL, 2003). Inicialmente os anestésicos foram empregados com objetivo de facilitar o manejo pela imobilização dos animais

(GRIFFITHS; WEBB; SCHNEIDER, 1941). Contudo, com o avanço da ciência foi possível compreender melhor a importância do emprego de anestésico para redução do estresse e a manutenção do bem estar animal durante o manejo e técnicas invasivas (NEIFFER; STAMPER, 2009). Atualmente existe um consenso no meio científico sobre a presença de mecanismos nociceptivos em peixes e invertebrados e sobre a capacidade desses animais em gerar respostas a estímulos estressantes/nocivos (SNEDDON, 2019; WINLOW; DI COSMO, 2019). Além de alterações comportamentais, esses estímulos podem desencadear uma série de respostas fisiológicas que impactam diretamente a saúde dos animais e, portanto, reforçam a necessidade dos sedativos e anestésicos na aquicultura (BARCELLOS et al., 2001; BARCELLOS; KREUTZ; QUEVEDO, 2006).

A sedação é um estado preliminar da anestesia onde ocorre diminuição da percepção sensorial e equilíbrio do animal, com presença ou não de analgesia. Com o aumento da dose/concentração e/ou tempo de exposição (quando administrado por banho de imersão) é possível atingir o estágio de anestesia, definido como: perda total da percepção sensorial, com depressão geral do Sistema Nervoso Central (SNC) envolvendo inconsciência, supressão da atividade reflexa e diferentes níveis de analgesia e relaxamento muscular. Além da eficácia um anestésico precisa, dentre outras características, ser de fácil administração, produzir rápida anestesia e recuperação sem intercorrências e com o mínimo de efeitos colaterais, produzir boa analgesia e relaxamento, ser bem tolerável ao animal, ao manipulador, deixar resíduos desprezíveis no filé ou apresentar curto período de retirada (ROSS; ROSS, 2008). Todas estas características contribuem para uma lista restrita de anestésicos disponíveis atualmente.

2.2.1 Regulamentação de sedativos e anestésicos utilizados na aquicultura

Metanossulfonato de triclaína (MS-222) ou mesilato de triclaína, 2-fenoxietanol, benzocaína, metomidato, quinaldina, eugenol e isoeugenol (princípio ativo do AQUI-S®) são os principais anestésicos com eficácia comprovada em aquicultura (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012). No entanto, as indicações e restrições de anestésicos em cada país/região são variadas, principalmente no que se refere ao período de carência (“*withdrawal time*”) (ROSA, 2016). No Brasil não há anestésicos aprovados e registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em aquicultura (SINDAN, 2020). Nos Estados Unidos o único aprovado pela FDA é o MS-222 com período de carência de 21 dias quando usado em animal destinado ao consumo humano (FDA, 1997). Informações mais

detalhadas sobre anestésicos registrados para uso em aquicultura em diferentes países e suas respectivas indicações estão descritas na tabela (1).

Tabela 1 – Anestésicos aprovados para uso em espécies aquáticas.

Substância ativa	País	Indicação	Período de carência	Referências
Metanossulfonato de tricaína ou Mesilato de tricaína	EUA	Peixes, anfíbios e outros animais aquáticos de sangue frio.	21 dias	FDA (1997)
	Itália, Reino Unido, Espanha, Noruega.	Peixes ornamentais e de cultivo.	70 graus-dia*	(ITÁLIA, 2013) (VMD, 2013) (AEMPS, 2013) (NOMA, 2013a)
	Canadá	Salmonídeos	5 dias	(HEALTH CANADA, 1997)
Benzocaína	Espanha, Noruega	Sedação e anestesia de Salmão do atlântico e Truta arco-íris.	7 graus-dia	(AEMPS, 2016) (NOMA, 2001)
Isoeugenol (AQUI-S®)	Noruega	Sedação e anestesia de Salmão do atlântico e Truta arco-íris.	2 graus-dia	(NOMA, 2013b)
	Nova Zelândia, Austrália	Sedação e anestesia de peixes em geral.	0 dias	(NZFS, 1994) (APVMA, 1997)
Eugenol	Japão	Sedação e anestesia de peixes e crustáceos	7 dias peixes	(MAFF, 2016)
			10 dias crustáceos	
Metomidato	Canadá EUA**	Peixes ornamentais	Não se aplica	(HEALTH CANADA, 1991) (FDA, 2009)

Graus-dia* = É a temperatura média da água multiplicada pelos dias necessários para a depuração. Para saber o tempo correspondente é necessário dividir o valor indicado para o anestésico (Ex. 70 graus-dia) pela temperatura (C°) média da água em que os animais estão aclimatados

Indexado** = não aprovado pela FDA, mas comercializado legalmente como um produto indexado pela FDA. A indexação é permitida para medicamentos destinados a espécies menores não produtoras de alimentos, como peixes ornamentais e estágios iniciais da vida de uma espécie menor produtora de alimentos (FDA, 2020).

Para o registro de medicamentos veterinários com aplicação em espécies produtoras de alimentos, as autoridades reguladoras devem definir, entre outros critérios, a ingestão diária aceitável (IDA) e os limites máximos de resíduos (LMR). A IDA é definida como a quantidade máxima de uma substância que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem risco apreciável à saúde humana; e LMR é a concentração máxima de resíduo de uma determinada substância legalmente permitida nos alimentos, considerando a ingestão diária aceitável (IDA) ou com base em uma IDA temporária utilizando um fator de segurança adicional. Também deve considerar, em que alimentos essa substância estará presente e qual a quantidade diária consumida destes alimentos pela população (EMA, 2011).

No Brasil a competência de estabelecer a IDA e o LMR de medicamentos veterinários em alimentos é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018). Recentemente a Anvisa publicou a Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019, que estabeleceu uma lista de LMR, IDA e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (ANVISA, 2019). Os valores adotados são aqueles recomendados pelo *Codex Alimentarius*, um programa conjunto da FAO e da OMS no qual o Brasil é um país-membro. Algumas substâncias, após criteriosa análise, são dispensadas de LMR por não apresentarem risco à saúde nas concentrações usualmente encontradas, enquanto para outras não é possível definir um LMR seguro e por isso são de uso proibido em animais produtores de alimento. Mesilato de tricafina e benzocaína (anestésico local) foram descritos na Instrução Normativa como IFA sem LMR necessário (ANVISA, 2019). Contudo, ainda não há nenhum medicamento registrado pelo MAPA com estes IFA no Brasil para uso na aquicultura (SINDAN, 2020).

Uma das grandes problemáticas no uso de anestésicos na aquicultura é a possibilidade destes fármacos e/ou metabólitos deixarem concentrações residuais que sejam prejudiciais à saúde dos consumidores, por isso o estabelecimento do período de carência destes produtos é um critério obrigatório para a sua comercialização (MAPA, 2009). O período de carência antes do abate é caracterizado como o tempo necessário para que o IFA e/ou seus metabólitos marcadores encontrados no alimento (no caso de peixes, músculo) fiquem abaixo do LMR estabelecido pelas autoridades competentes (ROSA, 2016). O período de carência de cada

produto veterinário aprovado deve ser determinado pela empresa que requerer a comercialização do produto com base em estudos farmacocinéticos de metabolismo e depleção do IFA e seus metabólitos com a formulação, dosagem, via de administração e espécie animal para o qual o produto será recomendado (MAPA, 2009; UNIÃO EUROPEIA, 2019).

No sentido de garantir a segurança alimentar, o período de carência de cada produto, o uso apenas de produtos aprovados pela legislação vigente e o seguimento correto da forma de uso indicada pelo fabricante, são fatores que devem ser rigorosamente obedecidos (MAPA, 2020). No entanto, estudos mostram que a falta de opção de anestésicos regularizados acaba gerando a necessidade do uso irregular destas substâncias. O eugenol e o isoeugenol, por exemplo, não são regulamentados como anestésicos para peixes na China, mesmo assim foram encontrados resíduos, principalmente de eugenol, em peixes disponíveis para consumidores em mercados chineses (KE et al., 2018).

Como visto na tabela 1, as opções de anestésicos ainda são restritas e com períodos de carências normalmente longos. Somado a isso, uma série de efeitos adversos já foram relatados com estes produtos, como reações de aversão causadas pelo MS-222 (READMAN et al., 2013), e elevação nos níveis plasmáticos de glicose e cortisol por MS-222, benzocaína, metomidato, 2-fenoxietanol e isoeugenol (SMITH et al., 2015; WEBER et al., 2011). Neste contexto, a busca por anestésicos seguros e eficazes é uma importante e necessária linha de pesquisa para o desenvolvimento da aquicultura. Como alternativa, os extrativos vegetais são bastante explorados devido à riqueza em constituintes químicos com atividade farmacológica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS ISOLADOS COM ATIVIDADE SEDATIVA E ANESTÉSICAS EM ESPÉCIES AQUÁTICAS

Óleos essenciais (OEs) são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e por isso ganharam destaque nas últimas décadas como alternativas terapêuticas e profiláticas na aquicultura (SOUZA et al., 2019; SUTILI et al., 2018). Os compostos encontrados nos OE são em sua maioria terpenos (SIMÕES; SPITZER, 2010). Esses metabólitos secundários são conhecidos por exercerem inúmeras atividade farmacológica, principalmente à nível de Sistema Nervoso Central, fato que despertou o interesse destas substâncias para uso em aquicultura como sedativos e anestésicos (HOSEINI; MIRGHAED; YOUSEFI, 2018). Diante do crescimento na aquicultura mundial, e a necessidade de anestésicos mais seguros aos animais, consumidores e meio ambiente, os produto naturais ganharam o interesse de pesquisadores.

O óleo de cravo (*Eugenia aromaticum*, *Eugenia caryophyllata*), composto majoritariamente por eugenol e em menor proporção isoeugenol, foi um dos primeiros produtos naturais com destaque na aquicultura como sedativo e anestésico (ANDERSON; MCKINLEY; COLAVECCHIA, 1997). Por anos pesquisadores desta área focaram seus estudos nestes produtos, de forma que a eficácia destes produtos naturais foi bem estabelecida frente a inúmeras espécies (JAVAHERY; NEKOUBIN; MORADLU, 2012). Atualmente, o eugenol e o isoeugenol são os únicos produtos de origem natural aprovados para uso na aquicultura (em alguns países) conforme visto na tabela 1. Em contrapartida, o FDA não recomenda o uso de óleo de cravo e/ou seus constituintes ativos (eugenol, isoeugenol e metileugenol) como anestésicos em espécies destinadas ao consumo humano, principalmente devido dados inconclusivos sobre estudos de carcinogenicidade (FDA, 2007). Além do óleo de cravo, o eugenol pode estar presente em OEs de outras plantas como o de *Ocimum gratissimum*, efetivo em anestésiar espécies como o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) (BOAVENTURA et al., 2020), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (DA SILVA et al., 2020), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (BOIJINK et al., 2016) e jundiás (SILVA et al., 2012).

OEs de plantas como *Aloysia triphylla* (GRESSLER et al., 2014), *Ocimum americanum* (SILVA et al., 2015), *Melaleuca alternifolia* (SOUZA et al., 2018b) e *Lippia alba* (CUNHA et al., 2010) possuem propriedades sedativa e anestésica frente ao jundiá e outras espécies (ALMEIDA et al., 2018; BENOVIET et al., 2012; SILVA et al., 2020; SIMÕES et al., 2017b). Além da eficácia anestésica é importante destacar que muitos desses compostos contribuem na melhoria de parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos animais, refletindo em sua saúde. O OE de *Aloysia triphylla*, por exemplo, promoveu proteção oxidativa e mitigou os efeitos de estresse com supressão da liberação de cortisol na anestesia de jundiás (GRESSLER et al., 2014). Em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) o mesmo OE reduziu os níveis de cortisol plasmático uma hora após a anestesia e não causou interferência no sabor ou odor dos filés após análise sensorial (TEIXEIRA et al., 2017).

Por se tratar de uma mistura complexa, na maioria das vezes não é possível identificar a participação de cada constituinte no efeito farmacológico dos OEs. Tal atividade pode ser resultante da adição ou sinergismo de dois ou mais componentes do OE. Benoviet et al., (2015) em estudo bio-guiado identificou que os compostos isolados do OE de *Aloysia gratissima* não promoveram anestesia em concentrações proporcionais às do OE em jundiás, indicando que o resultado final pode ser devido à interação dos constituintes. De forma contrária, Souza e colaboradores identificaram que dos constituintes majoritários presentes no OE de *M. alternifolia* (terpinen-4-ol 41,98%, γ -terpineno 20,15% e α -terpineno 9,85%) apenas o terpinen-

4-ol apresentou efeito sedativo e anestésico quando testado isoladamente em jundiás, e além disso, seu efeito foi antagonizado pelo α -terpineno (SOUZA et al., 2018b).

A interação dos componentes pode ocorrer à nível de receptores (farmacodinâmica) mas também por interação nos processos farmacocinéticos (OLIVEIRA; COSTA, 2004). Neste sentido, devido às possíveis interações de natureza desconhecida que podem ocorrer entre os componentes dos OE, estudos farmacológicos com os compostos isolados são importantes a fim de conseguir respostas mais específicas. Além dos citados anteriormente, substâncias isoladas como mentol (ZEIDAN; BARROSO; BOEHS, 2018), mirceno (MIRGHAED; GHELICHPOUR; HOSEINI, 2016), 1,8-cineol (MAZANDARANI; HOSEINI, 2017), citronelal (YOUSEFI et al., 2018), (+)-espatulenol (BENOVIT et al., 2015), (+)-dehidrofuquinona (GARLET et al., 2016), timol, carvacrol (BIANCHINI et al., 2017a) e linalol (*S*-(+) e *R*-(+)-linalol) (BALDISSEROTTO et al., 2018; HELDWEIN et al., 2014; SILVA et al., 2017) apresentam atividade sedativa e anestésica em diferentes espécies. Nota-se que maioria destes compostos são monoterpênicos. Adiante será abordada uma revisão mais detalhada sobre o linalol, composto alvo de investigação neste estudo.

2.4 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética engloba todos os processos relacionados ao movimento dos fármacos (ou outros xenobióticos) no organismo, são eles: absorção, distribuição, metabolismo (ou biotransformação) e excreção, denominado processo ADME (ABDEL-RAHMAN; KAUFFMAN, 2004). Resumidamente a efetividade de um fármaco depende primeiramente de sua capacidade em ser absorvido, no caso de vias de administração extravasculares. A partir desse momento, o fármaco precisa ser distribuído e disponibilizado ao seu sítio alvo em concentrações suficientes para produzir eficácia antes de ser totalmente metabolizado e excretado pelo organismo (FAN; LANNOY, 2014). Consequentemente, o conhecimento sobre a farmacocinética de um composto é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos medicamentos, além de garantir o sucesso terapêutico e reduzir a probabilidade de efeitos adversos (RANG et al., 2016).

A absorção consiste na transferência do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea e a velocidade e eficiência deste processo depende de fatores relacionados ao fármaco (ex. via de administração, concentração e características físico-químicas) e ao organismo (ex. permeabilidade capilar, fluxo sanguíneo, superfície de absorção e pH do meio) (JANG; HARRIS; LAU, 2001). Com exceção da via intravenosa, os fármacos precisam

atravessar as membranas biológicas para serem absorvidos, o que pode ocorrer por diferentes tipos de transporte. Fármacos solúveis em lipídeos, com baixo peso molecular e não ionizados atravessam facilmente as membranas por difusão simples. Com exceção da água e pequenos íons, os quais podem ser transportados por canais, demais substâncias requerem transportadores especializados (com ou sem gasto de energia) para transpor as membranas (FRIEDMAN, 2008).

Os anestésicos normalmente são substâncias lipossolúveis, fato que facilita a difusão pelo tecido branquial dos peixes, promovendo rápida e eficiente absorção quando administrados por banho de imersão (ODA et al., 2018). Além disso, pelas brânquias passa um alto fluxo sanguíneo, favorecendo ainda mais a troca de moléculas entre a água e o sangue. Acredita-se também que os anestésicos por banho de imersão podem sofrer absorção pela pele, mesmo que em quantidades pequenas, devido à característica lipofílica comum nesses fármacos (NEIFFER; STAMPER, 2009). Adicionalmente, os fármacos precisam estar dissolvidos no meio para serem bem absorvidos, portanto compostos mais lipofílicos (ex. eugenol) são previamente dissolvidos em algum solvente orgânico (ex. etanol) antes de serem adicionados à água para banho de imersão (Z AHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

Além dos fatores citados anteriormente, as características físico-químicas da água (ex. temperatura, salinidade, pH) podem interferir na farmacocinética de fármacos. Estudos demonstram que em temperaturas mais elevadas o processo de absorção e eliminação de anestésicos é mais eficiente, fato atribuído ao aumento da taxa metabólica dos peixes (GOMUŁKA et al., 2015; STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 1998; Z AHL et al., 2009). Como consequência, tempos menores de indução e recuperação anestésica são observados em temperaturas maiores (KRISTAN et al., 2014; SKÅR et al., 2017). Neste sentido, é necessário ter cautela ao se extrapolar o uso de fármacos na aquicultura entre espécies que estejam aclimatadas em condições diferentes.

Uma vez absorvido, o fármaco é transportado através da corrente sanguínea para os tecidos, processo este denominado de distribuição. O equilíbrio das concentrações do fármaco entre o plasma e os tecidos depende de vários fatores, entre os quais podemos destacar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar de cada região corpórea (RANG et al., 2016). Fármacos são distribuídos mais rapidamente para tecidos com maior aporte sanguíneo como cérebro, fígado e rins, comparado aos músculos esqueléticos e tecido adiposo (LIANG et al., 2012; SUN et al., 2010; XU et al., 2013). Segundo ROSS e ROSS (2008), na administração de fármacos por banho de imersão, a fração de fármaco absorvida pelas brânquias chega ao sangue arterial

eferente, o qual é uma rota muito curta até o sistema nervoso central (SNC). Isso garante o efeito quase que imediato dos anestésicos por esta via.

Como dito anteriormente, a distribuição de fármacos é limitada pela permeabilidade capilar em cada tecido, a qual é determinada pela estrutura dos capilares e pela natureza química do fármaco (RANG et al., 2016). Os capilares que circundam o SNC em vertebrados são formados por células endoteliais justapostas que dão origem à barreira hematoencefálica, responsável por restringir o acesso de muitas moléculas ao SNC (ABBOTT et al., 2010; O'BROWN; PFAU; GU, 2018). Portanto, o sucesso terapêutico de anestésicos e outros fármacos que atuam no SNC depende da capacidade dessas moléculas em atravessar a barreira hematoencefálica. Para isso, esses fármacos precisam de características químicas que facilitem a difusão por membranas (lipossolúveis, não ionizáveis e de pequeno tamanho molecular) para conseguirem penetrar no SNC sem precisar de transporte especializado (ZEIADEH et al., 2018).

A distribuição também pode ser afetada pela afinidade dos fármacos a proteínas plasmáticas e outros componentes teciduais. Fármacos com alta afinidade por proteínas plasmáticas (ex. albumina) levam mais tempo para chegar aos tecidos, pois apenas a fração não ligada do fármaco é capaz de deixar a corrente sanguínea e difundir-se para o tecido (BOHNERT; GAN, 2013). Já a afinidade de fármacos lipofílicos por compartimentos hidrofóbicos favorece a distribuição e o acúmulo desses fármacos no tecido muscular e adiposo. Essa é uma das preocupações do uso de anestésicos na aquicultura, pois a acumulação de anestésicos no filé pode fornecer risco à saúde do consumidor, de modo que é importante conhecer o período de depuração dessas substâncias através de estudos farmacocinéticos (KE et al., 2018; KILDEA; ALLAN; KEARNEY, 2004; MEINERTZ et al., 2014a; MEINERTZ; SCHREIER, 2009; SHI et al., 2016).

Após exercer o efeito farmacológico os fármacos precisam ser eliminados do organismo. A eliminação de fármacos e outros xenobióticos do organismo ocorre através dos processos de metabolização (ou biotransformação) e excreção. Muitos fármacos são eliminados em sua forma ativa, contudo existem aqueles que por características próprias necessitam previamente passar por metabolização (FAN; LANNOY, 2014). A metabolização pode ser caracterizada como a conversão do fármaco em outra entidade química através de reações enzimáticas (STORPIRTIS et al., 2011). O fígado é o principal responsável pela metabolização, contudo outros tecidos/órgãos como mucosa intestinal, rim, cérebro e plasma contribuem em menor grau (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A metabolização de fármacos ocorre através das reações de fase I (ex. oxidação, redução e hidrólise) e fase II (conjugação). As reações de fase I envolvem enzimas microsômicas (CYPs) hepáticas e extra-hepáticas. Essas reações consistem em introduzir na molécula um grupo reativo que irá servir de ponto de ataque para que o sistema de conjugação (reação de fase II) ligue um substituinte (ex. glicuronídeo), a fim de tornar o fármaco mais hidrossolúvel (TOZER; ROWLAND, 2009). Em peixes as principais subfamílias de CYPs envolvidas no metabolismo de fármacos são CYP1A e CYP3A, distribuídas principalmente no fígado e rim (FU et al., 2016; HASSELBERG et al., 2005; HEGELUND et al., 2004).

Quando administrados por determinadas vias, em particular a via oral, alguns fármacos podem ter suas concentrações reduzidas a níveis não terapêuticos devido ao metabolismo de primeira passagem. No caso da via oral, isso ocorre porque após absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), os fármacos são distribuídos ao fígado através da veia porta e sofrem metabolização antes de alcançarem a circulação sistêmica. A inativação pode ocorrer também no TGI (KUMAR; SURAPANENI, 2001; RANG et al., 2016; TOZER; ROWLAND, 2009). Na aquicultura, admite-se que a administração de anestésicos em peixes por banho de imersão é equivalente à anestesia inalatória em medicina humana e veterinária, portanto assume-se que grande parte do anestésico inalado chega ao SNC sem sofrer perda por metabolização de primeira passagem (ROSS; ROSS, 2008).

Em peixes a excreção de xenobióticos ocorre principalmente pelas brânquias, pois como já comentado, elas permitem a troca rápida de substâncias entre o sangue e a água (CONSOER et al., 2016; FREW et al., 2018; NEIFFER; STAMPER, 2009). Assim como na absorção, a eficiência da eliminação pelas brânquias depende de fatores como as características físico-químicas do fármaco (ERICKSON et al., 2006). Contudo, as vias renal e hepatobiliar podem ser importantes para a eliminação de certos fármacos, como já foi verificado com antibióticos (FENG; JIA, 2009; MANSOUR et al., 2017). Em *Salmo salar*, por exemplo, a eliminação dos anestésicos benzocaína, MS-222 e isoeugenol foi mais rápida com ventilação artificial, indicando que a via branquial é importante na eliminação destes anestésicos (KIESSLING et al., 2009). Segundo Zahl et al. (2012), os anestésicos utilizados na aquicultura são excretados na maior parte através das brânquias na forma inalterada (ativos), o que pode favorecer a reabsorção e o prolongamento do efeito anestésico se o animal ficar em um ambiente sem renovação de água. A produção de metabólitos tóxicos também seria um inconveniente.

2.5 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

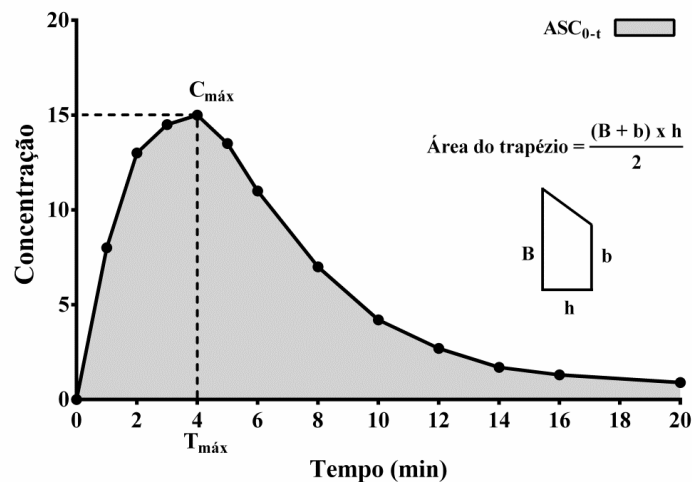
Os parâmetros farmacocinéticos são definidos com base nos resultados da análise temporal da concentração do fármaco ou metabólitos no plasma, sangue total ou produtos de excreção (ex. urina) (RANG et al., 2016). Em estudos experimentais, quando viável, alguns parâmetros também podem ser estimados em tecidos/órgãos (ex. cérebro, fígado, rim, músculo), visando responder questões sobre a distribuição, metabolização e/ou depuração tecidual (FANG et al., 2013; LIM et al., 2010; MEINERTZ et al., 2014a). O objetivo dos estudos farmacocinéticos é descrever através de modelos matemáticos o movimento do fármaco pelo organismo para que o seu uso possa ser feito de forma segura e efetiva (TOUTAIN, 2002), pois muitas substâncias candidatas à fármacos são descartadas devido ao comportamento farmacocinético inapropriado (FAN; LANNOY, 2014).

Para a estimativa dos parâmetros farmacocinéticos emprega-se abordagem de modelos compartimentais e não-compartimentais, no qual a escolha deve ser baseada no propósito analítico e na natureza dos dados. Os modelos compartimentais têm como premissas a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro dos compartimentos corpóreos. Ao plotar os dados da curva de concentração em escala semi-logarítmica (concentração em log) pode-se obter uma reta, e nesse caso o modelo empregado deve ser o monocompartimental. Ao se obter duas ou mais retas, modelos multicompartmentais devem ser aplicados (STORPIRTIS et al., 2011). Já a abordagem não compartimental baseia-se na área sob a curva de concentração versus tempo (AUC_{0-t}) e no tempo médio de residência (MRT), e pode ser aplicado a quaisquer dados experimentais, sendo o modelo dotado para avaliação de estudos de bioequivalência de fármacos (FAN; LANNOY, 2014; TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004a).

Parâmetros farmacocinéticos como o *clearance* total (Cl_T , unidade de volume/tempo, ex. L/min), biodisponibilidade (F, %), volume de distribuição aparente (V_d , unidade de volume, ex. L), meia-vida de eliminação ou meia-vida terminal ($T_{1/2\beta}$, unidade de tempo, ex. h), concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$), constante de eliminação (K_{el} , por unidade de tempo ex. /h) e a área sob a curva (AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, unidade da concentração vezes a unidade do tempo, ex. $\mu\text{g/mL h}$) são alguns dos principais parâmetros utilizados para interpretar a farmacocinética de um fármaco (FAN; LANNOY, 2014). Na aquicultura, quando a via de administração é por banho de imersão não se sabe a dose administrada, mas sim a concentração de fármaco na água (ex. mg/L). Portanto, alguns parâmetros como Cl_T , F e V_d não são possíveis de mensurar, e nesse caso $T_{1/2\beta}$, $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, K_{el} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$ são os parâmetros mais adotados (GOMUŁKA et al., 2015; GUÉNETTE et al., 2007; VORBACH et al., 2019).

$C_{m\acute{a}x}$ e $T_{m\acute{a}x}$ são parâmetros que podem ser obtidos pela análise direta da curva de concentração versus tempo após administração extravascular, pois esses são parâmetros referentes à fase de absorção, processo que não ocorre na via intravascular. $C_{m\acute{a}x}$ é uma medida dependente da velocidade de absorção ($T_{m\acute{a}x}$) e da dose/concentração absorvida (STORPIRTIS et al., 2011). A ASC_{0-t} representa a extensão da absorção e pode ser calculada pela soma das áreas dos trapézios obtidas na curva de concentração versus tempo (Figura 1). Posteriormente é possível encontrar o valor da ASC total ($ASC_{0-\infty}$). Valores de ASC são utilizados para calcular outros parâmetros como biodisponibilidade relativa e absoluta. A biodisponibilidade relativa se refere à porcentagem da dose administrada que atinge a circulação sistêmica por uma via extravascular comparada a uma via intravenosa ($F = 100\%$), enquanto a biodisponibilidade absoluta envolve a comparação de duas formulações (ou duas vias de administração da mesma formulação) (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004a).

Figura 1 – Curva hipotética da concentração plasmática/sanguínea de um fármaco em função do tempo após administração por via extravascular.



Fonte: Autor

O V_d é uma medida direta da extensão da distribuição de fármacos do plasma para os tecidos, embora não represente um volume fisiológico real. Fármacos menos lipofílicos têm tendência de ficarem mais concentrados no plasma e, portanto, apresentam menor V_d comparados a fármacos lipossolúveis, que são melhor distribuídos aos tecidos. O V_d também é influenciado pela ligação a proteínas plasmáticas, conseqüentemente fármacos com alta ligação a proteínas plasmáticas vão ficar mais tempo retidos no plasma e apresentar baixo V_d (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004b).

O Cl_T mede a capacidade total de eliminação do medicamento no organismo e envolve todos os mecanismos de eliminação, incluindo depuração renal (Cl_R), hepática (Cl_H) e outras vias adicionais (fezes, respiração, etc.) (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004c). O Cl_T pode ser obtido em qualquer modelo matemático e via de administração dividindo a dose administrada pela $ASC_{0-\infty}$ (STORPIRTIS et al., 2011). $T_{1/2}$ também é um parâmetro de eliminação e representa o tempo necessário para que a concentração plasmática/sanguínea restante diminua em 50% após o pseudo-equilíbrio de distribuição ter sido atingido, ou seja, a diminuição na concentração plasmática do fármaco ocorre apenas pela fase de eliminação e por isso o termo meia vida de eliminação ou meia vida terminal ($T_{1/2\beta}$) é mais indicado. Porém, o $T_{1/2}$ é muitas vezes interpretado como tempo necessário para eliminar metade da dose administrada do fármaco, o qual só é verídico em um modelo monocorpartimental por via intravenosa (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004d). O $T_{1/2}$ é um parâmetro secundário, pois depende do Cl_T e V_d do fármaco, sendo o valor resultante da equação $T_{1/2} = 0,693/K_{el}$, onde o valor da K_{el} (ou β no modelo bicompartimental) é a inclinação da fase terminal da curva em escala semi-logarítmica (STORPIRTIS et al., 2011). Tanto o Cl_T como a $T_{1/2}$ são parâmetros importantes para a determinação do regime de dosagem apropriado de um fármaco, pois permitem definir a dose/concentração e o intervalo de administração (FAN; LANNOY, 2014).

2.6 ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS COM ANESTÉSICOS EM PEIXES

Estudos farmacocinéticos com anestésicos em peixes incluem dados sobre o eugenol (ou óleo de cravo) (GUÉNETTE et al., 2007; KILDEA; ALLAN; KEARNEY, 2004), isoeugenol, benzocaína, MS-222 (KIESSLING et al., 2009) metomidato, (HANSEN; NYMOEN; HORSBERG, 2003), 2-fenoxietanol (HUANG et al., 2017) e propofol (ODA et al., 2018). Estudos recentes também descreveram a eliminação do timol (61.12% no OE de *L. sidoides*) e carvona (52.74% no OE de *L. alba*) em pacus após anestesia (*Piaractus mesopotamicus*) com os OEs (VENTURA et al., 2019a, 2019b).

O eugenol é rapidamente absorvido após administração por banho de imersão em diferentes espécies, mas sua eliminação parece ser dependente de outros fatores. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a $T_{1/2\beta}$ no plasma foi de 12,14 horas (75 mg/L, 4°C, 15 min), enquanto em linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) o eugenol apresentou $T_{1/2\beta}$ plasmática de 17,34 min (132,5 mg/L, 24°C, 10 min) (GUÉNETTE et al., 2007; TAGO et al., 2017). Dois fatores em particular podem ter contribuído com a diferença no $T_{1/2\beta}$: a temperatura da água e as diferenças inter-espécies. De modo geral, quando são observadas alterações

farmacocinéticas em relação à temperatura, verifica-se que o processo de eliminação do anestésico é mais eficiente em temperaturas mais elevadas (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012). O mesmo padrão ocorreu com a eliminação do propofol (12 e 17°C) em truta arco-íris, apesar disso, a eliminação foi considerada rápida nas duas condições ($T_{1/2}$ 1,1-1,5 h) (GOMUŁKA et al., 2015).

Em um comparativo entre os anestésicos benzocaína, MS-222 e isoeugenol em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), o MS-222 foi o que apresentou eliminação mais rápida segundo dados farmacocinéticos no plasma. Neste estudo também se observou que a eliminação dos anestésicos foi mais rápida nos animais com ventilação mecânica, indicando que as brânquias têm participação importante na eliminação destes anestésicos no salmão (KIESSLING et al., 2009). Esses dados corroboram os resultados encontrados para o MS-222 em *Squalus acanthias*, onde 95% do anestésico na forma inalterada foi eliminado pelas brânquias nas primeiras 2 h (STENGER; MAREN, 1974) e para a benzocaína em truta arco íris onde verificou-se eliminação de 59% do anestésico inalterado em 3 horas (MEINERTZ; GINGERICH; ALLEN, 1991). As vias renal e biliar também participam da eliminação de anestésicos, mas com menor participação e com a predominância de metabólitos, no caso da via renal, prevalece a excreção de metabólitos polares (MEINERTZ; GINGERICH; ALLEN, 1991; STENGER; MAREN, 1974).

O músculo (filé) é a parte comestível dos peixes destinada ao consumo, desta forma a depleção do anestésico neste tecido torna-se imprescindível para determinar a segurança do anestésico nessas espécies. Estudos farmacocinéticos sobre depleção residual fazem parte do processo de aprovação de novos medicamentos, mas também são úteis para melhor caracterizar a cinética de anestésicos já utilizados entre as diferentes espécies cultivadas (XU et al., 2020). Segundo Huang et al. (2017), a eliminação de diferentes anestésicos (eugenol, isoeugenol, benzocaína, 2-fenoxietanol e MS-222) no filé de tilápias do Nilo ocorre de forma rápida com $T_{1/2}$ que variam de 44,5 à 147,8 min. Contudo, diversos fatores podem interferir no processo de depleção tecidual de fármacos em peixes, o que é visto como um fator de risco, pois alterações no regime de exposição, características físico-químicas da água e composição do tecido (e outras diferenças fisio-anatômicas entre espécies) podem alterar a deposição e/ou eliminação dos resíduos (LIU et al., 2014; RAIRAT et al., 2019) Em poleiro prata (*Bidyanus bidyanus*) identificou-se que exposições repetidas de eugenol e temperaturas mais baixas diminuem a eficiência de sua depuração no músculo desta espécie (KILDEA; ALLAN; KEARNEY, 2004). Em truta arco-íris foi verificado um perfil semelhante, pois em temperatura mais baixa

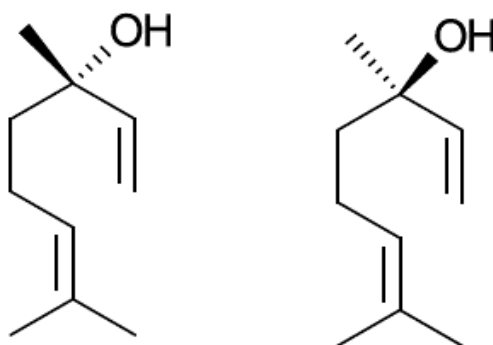
verificou-se maior deposição de resíduo de isoeugenol no filé após a exposição (MEINERTZ et al., 2006).

Com base nesta breve revisão sobre informações farmacocinéticas de anestésicos é notável que cada fármaco/substância apresenta um perfil cinético distinto, o qual é dependente de inúmeros fatores (ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012). Por conseguinte, o desenvolvimento de estudos farmacocinéticos com fármacos/substâncias utilizadas na aquicultura deve ser encorajado, principalmente referindo-se a sedativos/anestésico em que os dados existentes são limitados.

2.7 LINALOL

O linalol é um monoterpenoide encontrado nos OEs de diferentes plantas aromáticas, podendo estar presente na forma dos enantiômeros *S*-(+)-linalol e *R*-(-)-linalol (Figura 2). As plantas podem produzir os enantiômeros na forma pura ou como mistura racêmica, dependendo da espécie e parte vegetal. Os EOs de troncos e ramos grossos da *Aniba rosaeodora*, por exemplo, apresentam constituição de aproximadamente 100% de *R*-(-)-linalol puro, enquanto ramos pequenos contém 5–28% de *S*-(+)-linalol, atingindo 85% nas folhas (CHANTRAINE; DHÉNIN; MORETTI, 2009). Já outras plantas como *Ocimum americanum* (*R*-(-)-linalol) e *L. alba* (*S*-(+)-linalol) produzem apenas uma das formas enantioméricas (SILVA et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura química de *S*-(+)-linalol (esquerda) e *R*-(-)-linalol (direita).



Fonte: BIANCHINI (2017b)

O linalol possui muitas atividades farmacológicas comprovadas em mamíferos, com destaque às atividades ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante e analgésica. A modulação na

transmissão glutamatérgica é considerada um dos principais mecanismos associados ao efeito depressor no SNS, enquanto a ação sobre receptores opioides está relacionada à atividade analgésica (APROTOSOAIE et al., 2014; CHENG; SHEEN; CHANG, 2015; ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999; KATSUYAMA et al., 2015; LINCK et al., 2009; SOUSA et al., 2010). Em humanos, OEs contendo linalol como composto majoritário e/ou linalol isolado proporcionam ação sedativa e ansiolítica após tratamento com aromaterapia (KOOMHIN et al., 2020; OTA et al., 2017).

O interesse pelo *S*-(+)-linalol em nosso grupo de pesquisa surgiu a partir de estudos que comprovaram o efeito sedativo e anestésico em espécies aquáticas do OE de *L. alba* contendo *S*-(+)-linalol como constituinte majoritário (CUNHA et al., 2010; HELDWEIN et al., 2012). Posteriormente, as atividades sedativa e anestésica de *S*-(+)-linalol e de *R*-(-)-linalol foram comprovadas em jundiá (HELDWEIN et al., 2014; SILVA et al., 2017). Mais recentemente, a mistura racêmica de linalol (*R*-*S*-(±)-linalol) foi descrita como anestésica em carpa comum e tambaqui (BALDISSEROTTO et al., 2018; MIRGHAED; GHELICHPOUR; HOSEINI, 2016). Apesar de ambos enantiômeros apresentarem efeito sedativo/anestésico no jundiá, optamos por continuar esse trabalho com o *S*-(+)-linalol, pois os efeitos benéficos do OE de *L. alba* contendo *S*-(+)-linalol são bem conhecidos na aquicultura (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018a; BATISTA et al., 2018; SACCOL et al., 2013; SOUZA et al., 2018a; VEECK et al., 2018). Dados recentemente publicados sugerem que o linalol (mistura racêmica) alterou a atividade de enzimas (ALT e AST) e proteínas plasmáticas logo após anestesia (YOUSEFI et al., 2018), além de provocar aumento dos níveis de cortisol, glicose e estresse oxidativo (YOUSEFI et al., 2019) quando comparado ao eugenol e citronelal. Contudo a falta de dados e comparação com grupos controles (basal e sem anestésico) impede maiores interpretação desses dados.

2.7.1 Farmacocinética de linalol

Até o momento não se tem conhecimento da farmacocinética de nenhum dos enantiômeros de linalol em peixes, e em mamíferos as informações são escassas (APROTOSOAIE et al., 2014). Sabe-se que em humanos o *R*-*S*-(±)-linalol foi detectado no sangue 5 min após massagem por 10 min com OE de lavanda (*Lavendula angustifolia*, 24.79% de *R*-*S*-(±)-linalol) na região do estômago (JAGER et al., 1992). A aplicação dérmica de *R*-(-)-linalol também resultou em níveis sanguíneos detectáveis após 15 min (FRIEDL et al., 2010). Esses resultados corroboram o estudo de Cal e Sznitowska (2003), que descrevem a boa absorção cutânea de *R*-*S*-(±)-linalol em estudo *in vitro* com pele de humanos. No estudo de

Friedl et al. (2010) verificou-se também a rápida absorção de *R*-(-)-linalol por via inalatória em humanos, a qual também é associada à lipossolubilidade do linalol, pois facilita a difusão nos alvéolos (RANG et al., 2016). Em nenhum destes estudos foi mencionada a presença de metabólitos de linalol no plasma/sangue.

Em ratos após administração oral de *R*-*S*-(±)-linalol (500mg/kg) cerca de 23 e 25% da dose administrada foi excretada pela respiração e via hepatobiliar, sendo que na bile foi identificado apenas linalol na forma de metabólitos conjugados com ácido glicurônico. Isso é um indício que o *R*-*S*-(±)-linalol passa por metabolização hepática (PARKE; RAHMAN; WALKER, 1974). Reforçando essa hipótese, a presença de metabólitos conjugados na urina de ratos após administração via oral foi confirmada por Chadha and Madyastha (1984). Além disso, em estudo *in vitro* com microsomas hepáticos foram identificados metabólitos de *R*-*S*-(±)-linalol (óxido furanoide-linalol, diidrolinalol, óxido piranóide-linalol e 8-hidroxilinalol) após reação com as enzimas CYP2D6 e CYP2C19 (MEESTERS; DUISKEN; HOLLENDER, 2007).

Ao final de um período amostral de 72 horas após administração oral de *R*-*S*-(±)-linalol, cerca de apenas 3% do linalol permaneceu nos tecidos (fígado 0,5%, intestino 0,6%, pele 0,8% e músculo 1,2%). Os autores concluíram que a rápida excreção do linalol e seus metabólitos não sugere risco de acúmulo nos tecidos em caso de exposição prolongada (PARKE; RAHMAN; WALKER, 1974). Já outro estudo mais recente descreve que o *R*-*S*-(±)-linalol após administração por via oral em ratos (300mg/kg) possui menor biodisponibilidade comparada a uma formulação de linalol em sistema nanoestruturado, o que seria devido a menor solubilidade no TGI. Independentemente da formulação, o *R*-*S*-(±)-linalol apresentou $T_{1/2\beta}$ menores que 2 horas, indicando também rápida eliminação (SHI et al., 2016).

Essas informações sobre a farmacocinética de linalol em roedores e humanos, especialmente no que se refere a sua eliminação, são bons indícios que o *S*-(+)-linalol pode ter um perfil farmacocinético adequado em peixes quando administrado por banho de imersão. Além disso, o linalol é um fitoquímico bem tolerado por humanos, pois está presente em OEs utilizados em aromaterapia, em cosméticos, produtos de perfumaria e em alimentos como agente flavorizante (APROTOSOAIIE et al., 2014). O linalol também não oferece risco de bioacumulação no meio ambiente, pois é prontamente biodegradado em meio aquático, solo ou sedimentos (OECD, 2002). Esses fatores, somado à inexistência de dados sobre a farmacocinética de *S*-(+)-linalol em peixes, e o bom desempenho como sedativo e anestésico em jundiás (BIANCHINI et al., 2017a; HELDWEIN et al., 2014; SILVA et al., 2017), reforça a necessidade de estudos farmacocinéticos com este fitoquímico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DE *S*-(+)-LINALOL

O *S*-(+)-linalol foi isolado do óleo essencial de *L. alba* (Mill.) N.E. Brown fornecido pelo Campus do CESNORS em Frederico Westphalen. Para isolar o *S*-(+)-linalol do OE foi utilizada cromatografia em coluna (CC) com sílica gel 60 (malha 230-400; Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária e hexano:acetona (98:2 v/v) como fase móvel. Para obtenção de quantidade suficiente de *S*-(+)-linalol para todos os protocolos experimentais foram realizadas diferentes CC conforme descrito na metodologia de cada artigo (ver mais detalhes). As frações obtidas nas CC foram agrupadas conforme perfil cromatográfico revelado através de cromatografia em camada delgada (CCD). Após, as mesmas foram concentradas sobre pressão reduzida (40 °C) e caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

A cromatografia foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás (Agilent 7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um detector seletivo de massa 5975C operado no modo de ionização de elétrons a 70 eV e uma coluna capilar de sílica fundido não polar DB5-MS (5% de fenil, 95% de metilsiloxano; 30 m × 0,25 mm, espessura de película de 0,25 µm). O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, com temperatura do injetor, detector e interface definida para 250° C e a temperatura auxiliar definida para 280°C. A temperatura do forno foi mantida a 40° C por 4 min e depois aumentada a 4° C /min para 320° C. Soluções de amostra de 2 µL (2:1000 em hexano, v/v) foram injetadas no modo “split inlet” (proporção 1:50).

O índice de retenção de Kovats foi calculado usando uma série homóloga de C7–C40n-alcenos injetados nas mesmas condições que as amostras. O composto *S*-(+)-linalol foi identificado por comparação de espectros de massa e índice de retenção de Kovats com dados da Biblioteca Espectral de Massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2008) e segundo Adams (2009). A pureza do composto foi estimada através da integração da área do pico obtida a partir do cromatograma da amostra.

3.2 ANIMAIS

Os jundiás foram obtidos em uma piscicultura local (Arroio Grande, Santa Maria, Brasil) e transportados para o Laboratório de Fisiologia do Peixe da Universidade Federal de

Santa Maria (UFSM) para aclimação em tanques de 250L em um sistema de recirculação de água com filtros de carvão ativados.

Os parâmetros de qualidade de água, oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia total e nitrito foram monitorados diariamente a fim de mantê-los nas condições adequadas para a espécie (Tabela 2). Quando necessário foi promovida a troca parcial da água dos reservatórios. Os animais foram alimentados até a saciedade com ração comercial (42% de proteína bruta; Supra-Alisul Alimentos®, Cruz Alta, Brasil) uma vez ao dia e mantidos em jejum 24 horas antes dos experimentos. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFSM (número 8623130318).

Tabela 2 – Parâmetros de qualidade de água na aclimação de jundiás (*Rhamdia quelen*) (média \pm erro padrão).

Parâmetros	Experimentos	
	I	II
Oxigênio dissolvido (mg/L)	8,02 \pm 0,10	7,78 \pm 0,09
Temperatura (°C)	22,60 \pm 0,33	21,80 \pm 0,28
pH	7,31 \pm 0,21	7,43 \pm 0,13
Amônia total (mg/L)	0,35 \pm 0,03	0,29 \pm 0,06
Nitrito (mg/L)	0,20 \pm 0,0007	0,25 \pm 0,003

3.3 EXPERIMENTO I

3.3.1 Indução anestésica

Os jundiás (n = 78) foram expostos a um banho de imersão com 153 mg/L de *S-(+)-linalol* (densidade: 0,85 g/mL) previamente dissolvido em etanol a 95% (1:10) por no máximo 30 minutos. Essa concentração de *S-(+)-linalol* é equivalente a 180 μ L/L e foi estabelecida como anestésica para espécie em estudo anterior (HELDWEIN et al., 2014). O tempo máximo de 30 minutos de exposição foi determinado a partir de um teste piloto onde se verificou que 100% dos animais recuperaram-se da anestesia após exposição ao *S-(+)-linalol* por esse período. Após os 30 min de exposição os animais foram colocados em aquários sem anestésico para recuperação.

Antes das amostragens o estágio anestésico de cada animal foi verificado de acordo com o protocolo adaptado de Gomes et al. (2011), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Estágios de indução anestésica

Estágio (S)	Comportamento observado
S2	Perda parcial de equilíbrio e ausência de reação a estímulos externos*.
S3a	Perda total de equilíbrio, mas o peixe ainda manter a natação lateral.
S3b	Perda total de equilíbrio e capacidade de nado, mas o peixe ainda responde à pressão sobre o pedúnculo caudal com bastão de vidro.
S4	Anestesia profunda, os peixes ficam imóveis e não respondem à pressão sobre o pedúnculo caudal com bastão de vidro.

* estímulo externo: batida com bastão de vidro no fundo do aquário.

Os animais foram considerados recuperados ao demonstrarem capacidade normal de natação e equilíbrio, e também ao respondem à estimulação com bastão de vidro no fundo do aquário.

3.3.2 Coleta de sangue e tecidos

As coletas (n =6 por tempo, cada peixe foi amostrado uma única vez) foram realizadas em diferentes tempos após o início da exposição ao *S-(+)-linalol*. Portanto, foram realizadas coletas em animais que ainda estavam no anestésico (intervalos de tempos até 0,5 horas) e em animais que estavam em recuperação (de 0,5 até 24 h). Em 0,03, 0,16, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 1, 1,50, 2, e 4 h foram coletadas amostras de sangue com seringas heparinizadas por punção do pedúnculo caudal. Posterior à eutanásia por secção na medula espinhal foram amostrados os cérebros (no mesmo tempo que o sangue) e os demais tecidos (cérebro, rim, fígado, brânquias e músculo) em 0,03, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12 e 24 h após o início da indução anestésica com *S-(+)-linalol*.

Para obtenção do plasma o sangue foi centrifugado (Centrífuga 206-BL, Fanem[®], São Paulo, Brasil) à 1500 ×g por 10 min. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C (plasma e cérebro) e -80 °C (demais tecidos) até a realização das análises cromatográficas. Os resultados da quantificação de *S-(+)-linalol* no plasma e cérebro compõem o artigo 1, enquanto as análises nos demais tecidos (rim, fígado, brânquia e músculo) juntamente com as análises da água (ver a seguir experimento II) compõem o artigo 2.

3.4 EXPERIMENTO II: COLETA DE ÁGUA

Os animais (n=6) foram anestesiados por 30 min em um aquário contendo *S-(+)*-linalol (153 mg/L). Após esse período de exposição os animais foram mantidos em aquários (6 L) com renovação de água por 2 minutos a fim de remover o excesso de *S-(+)*-linalol presente na superfície dos animais. Após, cada animal foi transferido separadamente para outro aquário contendo 2L de água e mantidos até o final do experimento (48 h). As amostras de água foram coletadas em 0,5, 1,0, 2,0, 6,0, 24,0 e 48,0 h de recuperação. Os tempos de coletas foram escolhidos com base em um estudo piloto. Após cada período de coleta a água restante no aquário foi completamente renovada. As amostras de água foram armazenadas a -20 ° C até extração e análise cromatográfica. Como a água foi renovada a cada coleta (para diminuir a perda para o meio ambiente) os valores finais em cada tempo de coleta são resultado da soma com os valores obtidos nas amostras anteriores. Estes resultados então foram aplicados a seguinte equação: $ExLin = ([Lin] \times V)/(T \times W)$, em que: [Lin] é a concentração de *S-(+)*-linalol na água em cada tempo de amostragem; V é o volume de água em litros (V = 2L); e T é o tempo de excreção em horas, adaptado de Gonzalez et al. (1998). A excreção de *S-(+)*-linalol na água foi expressa em mg/kg h.

3.5 EXTRAÇÃO DE *S-(+)*-LINALOL DAS AMOSTRAS

3.5.1 Plasma e cérebro

Para extração de *S-(+)*-linalol 1 mL de hexano (grau analítico) foi adicionado em 500 µL de plasma e agitados em vórtex. Após, as amostras foram deixadas em repouso até a separação espontânea das fases. O sobrenadante (hexano) foi então filtrado através de uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE, 0,45 µm) e 1 mg/mL de timol (densidade = 0,96 g/mL, pureza de 98%; Sigma – Aldrich, São Paulo, Brasil) foi adicionado como padrão interno.

O tecido cerebral (total) foi pesado e homogeneizado (com auxílio de um pistilo de vidro) com 1,5 mL de metanol a 90%, e após, centrifugado a 16.000×g em centrifuga refrigerada (Centrifuga 5427R, Eppendorf®, EUA) à -4°C por 15 min. O sobrenadante resultante foi retirado, e o processo citado anteriormente foi repetido mais uma vez com a adição de 500 µL de metanol. Após esses processos os sobrenadantes resultantes das duas extrações foram misturados e centrifugados novamente para remover qualquer resíduo de tecido.

Posteriormente, 1,6 mL de hexano foi adicionado à solução de metanol contendo o *S*-(+)-linalol extraído do tecido. A amostra foi então centrifugada a $1300\times g$ por 5 min a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a fase hexânica foi filtrada em membrana PTFE. Ao final, foi adicionado o padrão interno ao filtrado (0,5 mg/mL de timol).

3.5.2 Demais tecidos (rim, fígado, brânquias e músculo)

Os tecidos (300 mg) foram homogeneizados (homogeneizador, Dremel 4000[®]) com 500 μL de metanol 90% (rim e fígado) ou 500 μL de solução salina à 0,9 % (brânquias e músculo). As soluções utilizadas para homogeneização dos tecidos foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos testes pilotos das curvas de calibração. Após homogeneização foi adicionado 1 mL de hexano (grau analítico) e as amostras foram agitadas em vórtex (30 s) e centrifugadas à $10,000 \times g$ (15000R centrifuga, Cientec[®], BR) at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. O sobrenadante (hexano) foi removido e o processo de centrifugação repetido com a adição de 500 μL de hexano. Ambos os sobrenadantes foram agrupados, filtrados com membrana PTFE e 50 $\mu\text{g/mL}$ de timol (padrão interno) foi adicionado às amostras como padrão interno.

3.5.3 Água

Para extração de *S*-(+)-linalol da água de recuperação foi adicionado 1 mL de hexano (grau analítico) a 2 mL de água. Após, as amostras foram agitadas (30 s) e deixadas em repouso para separação espontânea das fases. O sobrenadante (hexano) resultante foi filtrado em membrana PTFE e uma fração (500 μL) acrescida de padrão interno (timol 500 $\mu\text{g/mL}$) foi submetida à análise cromatográfica.

3.5.4 Validação dos métodos de extração

As técnicas de extração foram previamente validadas através de curvas analíticas de calibração (em triplicatas). Para isto, amostras das diferentes matrizes (plasma, tecidos ou água) foram fortificadas com concentrações conhecidas de *S*-(+)-linalol e padrão interno (timol). As mesmas foram submetidas aos processos de extração descritos acima para cada tipo de amostras (matriz). A curva analítica foi determinada pelo método de regressão linear e validada de acordo com seu coeficiente de correlação (r^2).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE S-(+)-LINALOL

As análises quantitativas das curvas analíticas e das amostras experimentais foram realizadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG–DIC) de acordo com as especificações técnicas descritas no artigo 1.

3.7 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Os parâmetros farmacocinéticos do S-(+)-linalol no plasma foram calculados usando métodos não compartimentais conforme descrito em Storpirtis et al., (2011). A constante de eliminação (K_{el}) foi obtida a partir da inclinação da fase terminal da curva de concentração versus o tempo (semi-logarítmico). A meia-vida terminal ($T_{1/2\beta}$) foi calculada usando a seguinte equação: $T_{1/2\beta} = 0,693/K_{el}$. A área sob a curva do tempo 0 até o último tempo de amostragem (ASC_{0-t}) foi calculada usando o método trapezoidal linear. Após a obtenção do parâmetro ASC_{0-t} , a área sob a curva de 0 ao infinito ($AUC_{0-\infty}$) foi estimada pela seguinte equação: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{final}/K_{el}$. A concentração máxima ($C_{máx}$) e o tempo máximo ($T_{máx}$) foram obtidos diretamente da curva de concentração.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) ou porcentagem. A homocedasticidade das variâncias dos dados foi avaliada por teste de Levene ou Kolmogorov–Smirnov. Dados paramétricos foram então submetidos à análise por ANOVA seguido de análises *post-hoc* utilizando o teste Tukey. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal–Wallis com análise *post-hoc* pelo teste de Dunn. Os testes estatísticos e a elaboração das figuras gráficas foram realizados no software GraphPad Prism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA). O nível mínimo de significância para todas as análises foi estabelecido em $p < 0,05$.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A presente tese é constituída de dois artigos. O primeiro artigo intitulado **“Pharmacokinetics of *S*-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: An anesthetic for aquaculture”** foi publicado no periódico “Aquaculture” (QUALIS-B2, Ciências biológicas II) e contempla os parâmetros farmacocinéticos de *S*-(+)-linalol no plasma e cérebro de jundiás.

O segundo artigo intitulado **“Tissue distribution and elimination of *S*-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*)”** foi publicado no mesmo periódico e traz os dados relacionados à distribuição de *S*-(+)-linalol nos demais tecidos (fígado, rim, brânquia, músculo), os parâmetros farmacocinéticos e também a excreção de *S*-(+)-linalol na água.

4.1 ARTIGO 1

Aquaculture 506 (2019) 302–307



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Pharmacokinetics of *S*-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: An anesthetic for aquaculture

Adriane Erbice Bianchini^a, Quelen Iane Garlet^b, Patrícia Rodrigues^b, Carine de Freitas Souza^a, Lenise de Lima Silva^a, Alessandro Casale dos Santos^a, Berta Maria Heinzmann^b, Bernardo Baldisserotto^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105 – 900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratório de Extrativos Vegetais, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anesthesia
Gas chromatography
Brain
Half-life terminal
Terpenoid

ABSTRACT

S-(+)-linalool is a phytochemical with proven sedative and anesthetic effects in silver catfish (*Rhamdia quelen*); however, the pharmacokinetic profile of this compound in fish remains unknown. Therefore, this study describes the pharmacokinetics of *S*-(+)-linalool in silver catfish anesthetized by immersion bath. Fish were exposed to 153 mg/L *S*-(+)-linalool for a maximum of 30 min. Blood and brain samples were collected at several time-points up to 4.0 h (0.5 h of anesthesia and 3.5 h of recovery) after the onset of exposure. Before each tissue/blood sampling, the anesthesia stage of each animal was recorded. Following *S*-(+)-linalool quantification in plasma and brain tissue by gas chromatography with flame ionization, concentration curves were constructed for determination of the pharmacokinetic parameters. *S*-(+)-linalool in the plasma and brain was detected within the first 2 min (0.03 h) of exposure, with maximum times (T_{max}) of 0.50 and 0.33 h and maximum concentrations (C_{max}) of 129.33 µg/mL and 113.92 µg/g, respectively. Other parameters estimated for the plasma and brain were terminal half-lives ($T_{1/2\beta}$) of 1.36 and 57.27 h, elimination constants (K_{el}) of 0.50 and 0.01/h, areas under the curve from zero to 4.0 h (AUC_{0-4}) of 120.98 µg/mL/h and 250.57 µg/g/h, and AUCs from zero to infinity ($ASC_{0-\infty}$) of 132.15 µg/mL/h and 4946.13 µg/g/h, respectively. After 10 min (equivalent to a collection time of 0.66 h) in a drug-free bath, all animals recovered from anesthesia. These results suggest that *S*-(+)-linalool is promptly absorbed into the bloodstream and widely distributed to the brain. Elimination is efficient in plasma but slower in the brain, yet this factor does not impair the recovery of animals, which occurs quickly. Therefore, *S*-(+)-linalool holds a pharmacokinetic profile suitable for its application as an anesthetic in aquaculture.

1. Introduction

The benefits of anesthetics in aquaculture have already been proven and reaffirmed by numerous studies (Zahl et al., 2012; Priborsky and Velisek, 2018). Consequently, interest in anesthetics that are safe for both the animals and the manipulators and with low environmental impact has motivated research in natural products for this purpose. Several essential oils (EOs) have already been reported to be used as anesthetics for fish, such as the EOs of *Lippia alba*, *Aloysia triphylla*, *Aniba rosaeodora*, *A. parviflora*, and *Cymbopogon nardus* (Cunha et al., 2010; Barbas et al., 2017; Becker et al., 2017; Baldisserotto et al., 2018). The anesthetic activity of EOs is thought to derive from the action of terpenoids on the central nervous system (CNS) (Passos et al., 2009; Manayi et al., 2016). In this sense, isolated terpenoids are promising sources of anesthetics for fish farming (Heldwein et al., 2014;

Benovit et al., 2015; Garlet et al., 2016; Mirghaed et al., 2016; Bianchini et al., 2017; Silva et al., 2017; Souza et al., 2018; Hoseini et al., 2018).

The target of this study, the monoterpenoid *S*-(+)-linalool, is one of the enantiomeric forms of linalool and is present in the EOs of several plants, including the linalool-rich chemotype of *L. alba*, which is cultivated in southern Brazil and other regions of the world (Chanotiya and Yadav, 2009; Heldwein et al., 2012). Linalool is known to have pharmacological effects, with emphasis on its reported anxiolytic and sedative activities in experimental animals and humans (Sugawara et al., 1998; Friedl et al., 2010; Aprotosoae et al., 2014). Within aquaculture, interest in *S*-(+)-linalool arose from studies that demonstrated the anesthetic efficacy of the *S*-(+)-linalool chemotype from *L. alba* EOs in several aquatic species (Cunha et al., 2011; Parodi et al., 2012; Toni et al., 2015; Hohlenwerger et al., 2016; Simões et al., 2017;

* Corresponding author.

E-mail address: bbaldisserotto@hotmail.com (B. Baldisserotto).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.044>

Received 16 January 2019; Received in revised form 18 March 2019; Accepted 21 March 2019

Available online 22 March 2019

0044-8486/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Almeida et al., 2018). The sedative and anesthetic qualities of *S*-(+)-linalool were first described by Heldwein et al. (2014) in silver catfish (*Rhamdia quelen*). In addition, other studies have been carried out to gain knowledge about the use of this phytochemical as a fish anesthetic (Bianchini et al., 2017; Silva et al., 2017). Recently, a racemic mixture of linalool was demonstrated to have sedative and anesthetic activities in the tambaqui (*Colossoma macropomum*) and common carp (*Cyprinus carpio*) (Mirghaed et al., 2016; Baldisserotto et al., 2018).

For these reasons, *S*-(+)-linalool is a target molecule with great potential in the development of a natural anesthetic for use in aquaculture. Nonetheless, no matter how robust the biological activity of a substance, its recognition and approval for therapeutic use is dependent, in part, on its pharmacokinetic profile (Fan and Lannoy, 2014). In aquaculture, it is expected that an anesthetic will be readily absorbed and distributed to the target tissues, in this case, to the brain. After, rapid elimination is ideal for providing efficient recovery and avoiding possible accumulation in the body (Zahl et al., 2012). To date, there are no literature reports regarding the pharmacokinetics of *S*-(+)-linalool in fish, which motivated the design of this study. For such purposes, the pharmacokinetics of *S*-(+)-linalool in plasma and brain tissue of the silver catfish after animal sedation/anesthesia with this compound in an immersion bath was estimated.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Silver catfish (140.62 ± 3.81 g and 31.70 ± 0.41 cm) were obtained from a local fish farm (Arroio Grande, Santa Maria, Brazil) and transported to the Fish Physiology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (UFSM) for acclimation in 250-L tanks in a water recirculation system with activated charcoal/stone filters. The dissolved oxygen, temperature, and pH were monitored daily and maintained at the recommended values for this species throughout the acclimation and experimental period (22.60 ± 0.33 °C, pH 7.31 ± 0.21 , dissolved oxygen 8.02 ± 0.10 mg/L, total ammonia 0.35 ± 0.03 mg/L, and nitrite 0.20 ± 0.0007 mg/L). Animals were fed to satiety with commercial feed (42% crude protein; Supra-Alisul Alimentos®, Cruz Alta, Brazil) once daily and fasted 24 h prior to experiments. The protocol was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of UFSM (number 8623130318).

2.2. Essential oil (EO) extraction and *S*-(+)-linalool isolation

Lippia alba EO (leaves) was obtained as described by Bianchini et al. (2017). *S*-(+)-linalool was isolated from the EO of *L. alba* (12 g) by column chromatography (65×6.5 cm) containing 1200 g of silica gel 60 (230–400 mesh; Merck, Darmstadt, Germany), as the stationary phase, and hexane:acetone (98:2 v/v) as the mobile phase at an average flow of 2.5 mL/min. The collected fractions (25 mL) were grouped according to the chromatographic profile in thin-layer chromatography, concentrated under reduced pressure (40 °C) and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS). The isolation process provides 3.74 g of *S*-(+)-linalool with 98.00% purity.

GC–MS was run using an Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) gas chromatograph coupled to a 5975C mass selective detector operated in the electron ionization mode at 70 eV, and a non-polar DB5-MS fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane; $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$, 0.25 μm film thickness). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min, with the injector, detector, and interface temperature set to 250 °C, and the auxiliary temperature set to 280 °C. The oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and then increased at 4 °C/min to 320 °C. Sample solutions of 2 μL (2:1000 in hexane, v/v) were injected in split inlet mode (1:50 ratio). Kovats retention index was calculated using a homologous series

of C7–C40 *n*-alkanes injected under the same conditions as the samples. The compound *S*-(+)-linalool was identified by mass spectra and Kovats retention index comparison with data from the National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library (NIST, 2008) and with Adams (2009). Compound purity was estimated by under peak area integration obtained from the total ion current chromatogram.

2.3. Experimental design

Water from acclimation tanks was used in the aquariums (2L) for fish sedation/anesthesia and recovery, to maintain the same conditions during the experimental period. Silver catfish were exposed to an immersion bath with 153 mg/L (density: 0.85 g/mL) *S*-(+)-linalool (anesthetic concentration according to Heldwein et al., 2014) previously dissolved in 95% ethanol (1:10), for 30 min maximum. This time was estimated from a pilot test that verified 100% recovery from anesthesia after fish were relocated to a drug-free aquarium.

Blood samples were collected with heparinized syringes by puncture of the caudal peduncle at 0.03, 0.16, 0.33, 0.50, 0.66, 0.83, 1.00, 1.50, 2.00 and 4.00 h after onset of *S*-(+)-linalool exposure ($n = 6$ per time point, each fish sampled once, total = 60 fish). Animals sampled after 0.5 h were removed from the aquarium containing *S*-(+)-linalool and placed into a recovery aquarium without anesthetic for the collections at the remaining time points (0.66, 0.83, 1.00, 1.50, 2.00 and 4.00 h). Plasma was obtained by centrifugation at $1500 \times g$ for 10 min (Centrifuge 206-BL, Fanem®, São Paulo, Brazil). After plasma sampling at each time point, all fish were euthanized by spinal cord sectioning for removal of the brain tissue. All samples were stored at -20 °C until chemical analysis.

2.3.1. Anesthetic parameters

Before sampling, the anesthetic stage of each animal was verified according to the protocol adapted from Gomes et al. (2011). Namely, stage (S)2, with sedation characterized by loss of response to external stimuli, determined by hitting the bottom of the aquarium with a glass rod; S3a, characterized by a total loss of balance, with fish still able to maintain their swimming ability; S3b, total loss of equilibrium and swimming ability, with fish still responsive to application of pressure on the caudal peduncle using a glass rod; and S4, deep anesthesia, in which fish do not respond to any external stimuli. The animals were considered recovered once they had demonstrated normal swimming capacity and equilibrium, and also responded to stimulation from a glass rod hitting the aquarium bottom.

2.4. Quantification of *S*-(+)-linalool in plasma and brain tissue

S-(+)-linalool was extracted from plasma by adding 1 mL hexane to plasma (500 μL), which was then vortexed to mix and allowed to rest for spontaneous phase separation. The hexane phase was filtered through a polytetrafluoroethylene membrane (PTFE, 0.45 μm), and 1 mg/mL thymol (density 0.96 g/mL, 98% purity; Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) was added as an internal standard (IS).

Total brain tissue was homogenized with 1.5 mL of 90% methanol and centrifuged at $16,000 \times g$ (Centrifuge 5427R, Eppendorf®, USA) at -4 °C for 15 min to extract *S*-(+)-linalool. After separation of the supernatant, extraction with methanol (500 μL) was repeated once more. The resulting supernatants were mixed and centrifuged again to remove any tissue residue. Subsequently, 1.6 mL hexane was added to the *S*-(+)-linalool–methanol solution. The sample was then centrifuged at $1300 \times g$ for 5 min at -4 °C, and the hexanic phase filtered through a PTFE membrane (0.45 μm). The IS (0.5 mg/mL thymol) was added to 1 mL of the filtrate.

Quantitative analysis of plasma and brain samples was performed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC–FID). The chromatographic method was run in an Agilent 7890A gas

chromatograph using a non-polar DB5-fused silica capillary column (5% phenyl, 95% methylsiloxane; 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min, with the injector, detector, and interface temperatures set to 250 °C, and the auxiliary temperature set to 280 °C. The oven temperature was kept at 40 °C for 2 min and then ramped at 5 °C/min to 160 °C, with the total run time set to 28 min. Sample solutions obtained by plasma or brain extraction were injected (4 µL) onto the column in splitless mode using an automatic sampler. Peaks of S-(+)-linalool in plasma and brain were identified by the retention times relative to analytical curves.

2.4.1. Calibration curves

Plasma or brain homogenates (500 µL) were fortified with known concentrations of S-(+)-linalool (0.000085, 0.000425, 0.000850, 0.004200, 0.008500, 0.042500, 0.085000, and 0.425000 mg/mL), in triplicate, and then subjected to the same procedure as described above for the experimental samples (Section 2.4) to construct the calibration curves.

2.5. Pharmacokinetic parameters

The pharmacokinetic parameters of S-(+)-linalool in plasma were calculated using non-compartmental methods (Storpiertis et al., 2011). The elimination constant (K_{el}) was obtained from the terminal phase slope of the concentration curve versus time (semi-logarithmic). The terminal half-life ($T_{1/2\beta}$) was calculated using the following equation: $T_{1/2\beta} = 0.693/K_{el}$. The area under the curve of time 0 until the last sampling time (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal method. After obtaining the AUC_{0-t} parameter, the area under the curve from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was estimated by the following equation: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{last}/K_{el}$. The maximum concentration (C_{max}) and maximum time (T_{max}) were obtained directly from the concentration versus time curve.

2.6. Statistical analysis

The original or transformed data were submitted to Levene's test, to determine the homogeneity of variances and then evaluated by a one-way ANOVA. The statistical tests were performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA, EUA, version 6.0), and the minimum significance level for all analyses was set at $p < .05$. Data are reported as mean ± SEM or as percentages.

3. Results

3.1. Chromatogram and analytical method validation

The retention time of S-(+)-linalool and the IS in the analytical curves of plasma (Fig. 1a) and brain (Fig. 1b) were 14.20 and 19.87 min, respectively. The absence of volatile metabolites in detectable concentrations was verified by comparing the GC-FID chromatograms of the experimental samples (Fig. 1c and d) with blanks of the plasma and brain samples fortified with the IS (Fig. 1a and b).

Calibration curves were constructed for the 0.00085–0.425 and 0.004250–0.425000 mg/mL ranges for plasma and brain, respectively, which included values greater than or equal to the quantification limit (QL), considering a QL ≥ 10 noise-to-signal ratio. Equations obtained by linear regression of the calibration curves for plasma and brain were $y = 0.4180x + 0.002463$ and $y = 0.3899x - 0.001631$, respectively, where: y is the concentration ratio of S-(+)-linalool-to-IS, and x is the peak area ratio of S-(+)-linalool-to-IS (Fig. 2). The extraction methods for plasma and brain presented satisfactory regression coefficients ($r^2 = 0.9956$ and $r^2 = 0.9953$, respectively) and coefficients of variation (3.95 and 9.18%, respectively).

3.2. Concentration curves and pharmacokinetic parameters

S-(+)-linalool was found in quantifiable concentrations at all collection times. The S-(+)-linalool concentration in the plasma was significantly higher than in brain tissue at 30 min but statistically lower from 60 min (Fig. 3).

The pharmacokinetic parameters estimated from quantification of S-(+)-linalool in the plasma and brain of silver catfish are described in Table 1. S-(+)-linalool reached a C_{max} of 129.33 µg/mL in the plasma at 0.50 h (T_{max}). In the brain, the C_{max} was 113.92 µg/g at 0.33 h (T_{max}). The K_{el} of S-(+)-linalool was higher in the plasma ($K_{el} = 0.50/h$) when compared with the brain ($K_{el} = 0.01/h$) and, consequently, the $T_{1/2\beta}$ of S-(+)-linalool estimated for the plasma was lower ($T_{1/2\beta} = 1.36$ h) than that estimated for the brain ($T_{1/2\beta} = 57.27$ h). In addition, the AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ in the plasma (120.98 and 132.15 µg/mL/h) were lower than those estimated in the brain (250.57 and 4946.13 µg/g/h).

3.3. Anesthetic parameters

The percentage of animals within each anesthetic stage at the respective sampling times are described in Table 2. No mortality was observed in animals exposed to S-(+)-linalool.

4. Discussion

This study has highlighted certain relevant aspects of S-(+)-linalool pharmacokinetics in silver catfish. The concentration of S-(+)-linalool was elevated in the plasma within the first minutes after exposure, with C_{max} occurring within 30 min (T_{max}). This profile indicates a rapid absorption of S-(+)-linalool by the fish, as has been demonstrated with other anesthetics, such as eugenol and metomidate, administered by the same route in fish (Hansen et al., 2003; Guénette et al., 2007). Absorption is characterized by drug transport from the site of administration to the systemic circulation and is modulated by several factors (Storpiertis et al., 2011). The rapid absorption of anesthetics by immersion bath is attributed to the high blood flow and absorptive area of the gills, which facilitates the exchange of substances between the external environment and the blood (Zahl et al., 2012). These factors, together with the high lipid solubility and low molecular weight of S-(+)-linalool (Belsito et al., 2008), explain its efficient diffusion process through the gill membrane.

The distribution of many molecules to the brain is limited by the blood–brain barrier (Zeideh et al., 2018). Therefore, crossing through this barrier is a decisive factor for the therapeutic success of drugs targeting the CNS. In the current study, it was demonstrated that after absorption by immersion bath, S-(+)-linalool is widely distributed to the brain, with an AUC_{0-t} two-fold higher than in the plasma. The easy penetration of S-(+)-linalool into the brain can also be attributed to its lipid solubility ($\log P = 2.75$) since compound lipophilicity is a determinant factor for diffusion of molecules through the cerebral blood capillaries (Belsito et al., 2008; Shinoda, 2016; O'Brown et al., 2018). Although the anesthetic mechanism of action of S-(+)-linalool in fish remains unknown (Heldwein et al., 2014; Bianchini et al., 2017), these significant levels in the brain explain its anesthetic activity.

It is worth highlighting that even though the fish were exposed to S-(+)-linalool for up to 30 min, the C_{max} in the brain occurred at approximately 20 min (T_{max}), followed by a decrease in tissue concentration. The lack of previous studies in aquaculture research that share the same method used in this work makes it difficult to interpret this result. However, the kinetic behavior of S-(+)-linalool in the brain may explain why this compound did not induce medullary collapse (death) after 30 min of exposure since the average time to deep anesthesia in silver catfish with S-(+)-linalool (153 mg/L) is only 11.8 min (Heldwein et al., 2014). Taken together, these results and the absence of mortality during the experiments presented show that S-(+)-linalool-induced anesthesia at this concentration may offer a safe

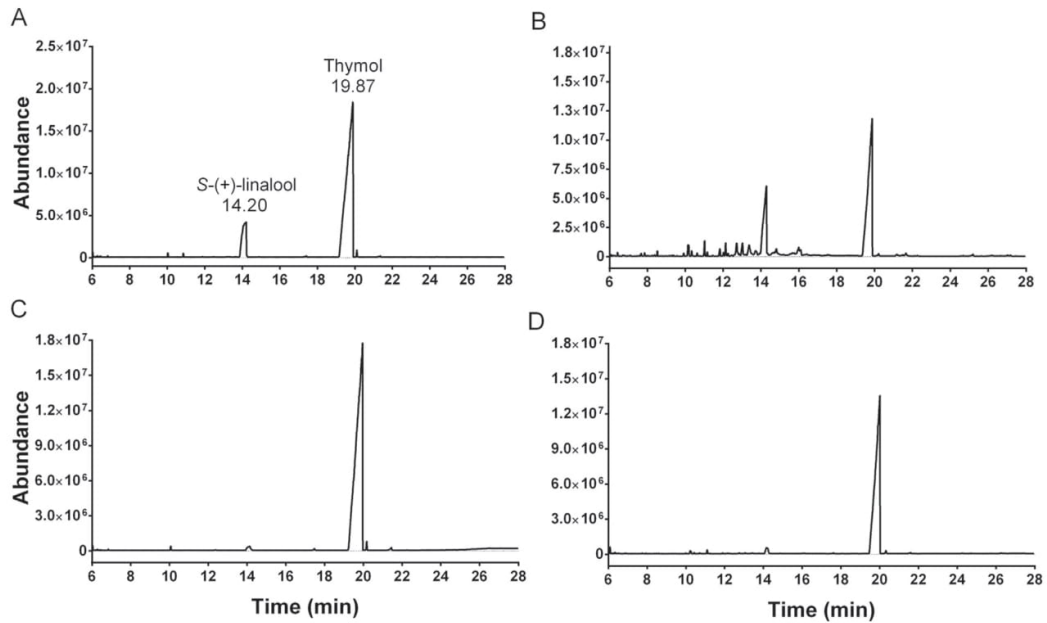


Fig. 1. Representative chromatograms of S-(+)-linalool in analytical curves samples in plasma (A) and the brain (B), of the plasma sample at 30 min (C) and of the brain sample at 20 min (D).

therapeutic window. However, more studies are needed to determine the physiological and biochemical effects of this prolonged exposure to S-(+)-linalool because in common carp, the racemic mixture of linalool negatively modulated some parameters, such as glucose and cortisol, after prolonged exposure (3 h) (Mazandarani et al., 2017; Yousefi et al., 2019). Besides, it is necessary to determine the optimal concentrations for sustained anesthesia during prolonged procedures (Neiffer and Stamper, 2009).

S-(+)-linalool presented a T_{1/2β} in plasma of 1.36 h, highlighting the rapid plasma elimination of this compound by the silver catfish. This plasma elimination profile is similar to data obtained for the racemic mixture of linalool after oral administration in rats (Shi et al., 2016) and for R-(−)-linalool after inhalation and topical application in humans (Friedl et al., 2010). Additionally, the T_{1/2β} value for this phytochemical is much lower than those found for eugenol during anesthesia of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (19.79 h) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (12.14 h) (Guénette et al., 2007; Zhao et al., 2017). Conversely, this T_{1/2β} was similar to the plasma T_{1/2β} of propofol by immersion bath in rainbow trout (1.5 and 1.1 h at 12 and

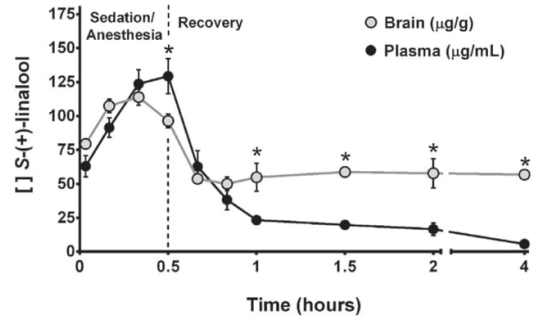


Fig. 3. S-(+)-linalool concentration versus time (hours) in plasma and the brain of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) (n = 6). (*) Indicates difference between plasma and brain samples at the same time. One-way ANOVA p < .05.

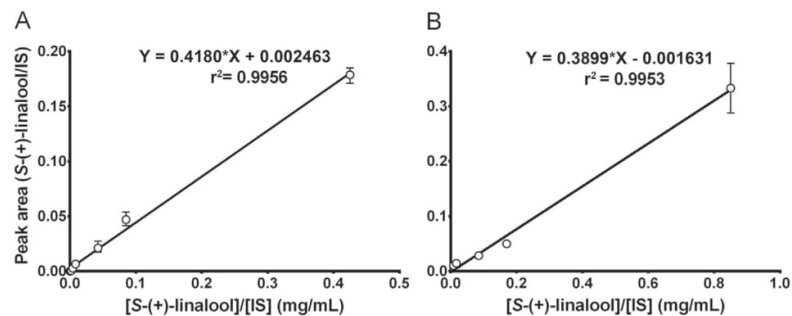


Fig. 2. Analytical curves for quantification of S-(+)-linalool in plasma (A) and the brain (B). IS = internal standard; y = peak area ratio of S-(+)-linalool-to-IS; x = concentration ratio of S-(+)-linalool-to-IS (mg/mL).

Table 1

Pharmacokinetic parameters of S-(+)-linalool (153 mg/L) in the plasma and brain of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath.

Pharmacokinetic parameters	Plasma	Brain
T _{max}	0.50 h	0.33 h
C _{max}	129.33 µg/mL	113.92 µg/g
T _{1/2β}	1.36 h	57.27 h
K _{el}	0.50/h	0.01/h
ASC _{0-t}	120.98 µg/mL/h	250.57 µg/g/h
ASC _{0-∞}	132.15 µg/mL/h	4946.13 µg/g/h

T_{max} = maximum time; C_{max} = maximum concentration; T_{1/2β} = terminal half-life; K_{el} = elimination constant; ASC = area under the curve from time zero to 4 h (ASC_{0-t}) or to infinity (ASC_{0-∞}).

Table 2

Percentage of animals (n = 6) at each stage of anesthesia during the sampling period.

Collection time (hours)	Anesthesia stage (%)			Recovery
	S3a	S3b	S4	
0.03	100	0	0	-
0.16	0	33.33	66.67	-
0.33	0	0	100	-
0.50	0	0	100	-
0.66-4	0	0	0	100

S3a, characterized by a total loss of balance, with fish able to maintain their swimming ability; S3b, total loss of equilibrium and swimming ability, with fish still responsive to application of pressure on the caudal peduncle using a glass rod; S4, deep anesthesia, in which fish do not respond to any external stimuli.

17 °C, respectively) and koi carp, *C. carpio* (1.9 h) (Gomulka et al., 2015; Oda et al., 2018).

From practical and clinical perspectives, according to Toutain and Boustquet-Melou (2004), problems associated with accumulation are minimal for drugs exhibiting a plasma T_{1/2β} shorter than 12 h. In clinical practice, at a time point that is 5–7 times the value of T_{1/2β}, it is assumed that almost every drug has already been eliminated from the body or that the concentration still present (about 3.0% or 0.8%) is clinically irrelevant (Storpirtis et al., 2011). Thus, after 9.5 h, only insignificant concentrations of S-(+)-linalool would be present in the plasma. Note that differences between species and experimental conditions (e.g., temperature) often influence the pharmacokinetics of drugs (Stehly et al., 1998; Meinertz et al., 2006; Junping et al., 2012) and, therefore, extrapolation from results in aquaculture should be made with caution (Vergneau-Grosset, 2017).

S-(+)-linalool showed an extended T_{1/2β} (57.27 h) in the brain. Although there is little literature information involving fish, it is known that drug kinetics in the brain are limited by blood flow, while kinetics in the systemic compartment also depend on the efficiency of the metabolizing and excretory organs (Upton, 2007). For these reasons, there are differences between the kinetic behavior of some drugs in the blood and brain (Ludbrook et al., 2002). Also, the higher affinity of S-(+)-linalool for brain tissue (a lipophilic medium) as compared with its affinity for plasma (an aqueous medium) may have decreased the elimination efficiency from the brain. The prolonged T_{1/2β} of S-(+)-linalool in the brain could extend its depressant effect in the CNS. However, at 0.66 h (10 min recovery), the remaining concentration in the brain did not cause any visible behavioral changes, and 100% of the animals were considered recovered according to the criteria of Gomes et al. (2011).

Finally, the data obtained in this study provide important information guiding the future application of this phytochemical as an anesthetic in aquaculture. The results obtained herein allow concluding that an anesthetic concentration of S-(+)-linalool is rapidly absorbed and distributed to the brain after immersion bath. The plasma T_{1/2β} also

indicates rapid elimination of this compartment; a lower elimination efficiency was observed in the brain but this did not impair the recovery of animals from anesthesia.

Acknowledgements and financial support

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) – PhD fellowships to A.E. Bianchini, Q.I. Garlet, A.C. Santos, C.F. Souza and MSc fellowships to P. Rodrigues – “Finance Code 001”. B.M. Heinzmann and B. Baldisserotto received research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

CRediT authorship contribution statement

Adriane Erbice Bianchini: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Quelen Iane Garlet:** Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Patrícia Rodrigues:** Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Carine de Freitas Souza:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - review & editing. **Lenise de Lima Silva:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - review & editing. **Alessandro Casale dos Santos:** Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing. **Berta Maria Heinzmann:** Supervision, Resources, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Bernardo Baldisserotto:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

References

- Adams, R.P., 2009. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Almeida, A.P.G., Heinzmann, B.M., Val, A.L., Baldisserotto, B., 2018. Essential oils and eugenol as anesthetics for *Serrasalminus rhombus*. Bol. Inst. Pesca 44, 44–50. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.195>.
- Aprosoaie, A.C., Hâncianu, M., Costache, I.I., Miron, A., 2014. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. Flavour Fragr. J. 29, 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>.
- Baldisserotto, B., Barata, L.E.S., Silva, A.S., et al., 2018. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. Neotropical Ichthyol. 16, e170128. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170128>.
- Barbas, L.A.L., Hamoy, M., de Mello, V.J., et al., 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: a new anaesthetic for use in fish. Aquaculture 479, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>.
- Becker, A.G., Luz, R.K., Mattioli, C.C., et al., 2017. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophosilurus alexandri* after transport? Aquaculture 481, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007>.
- Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., et al., 2008. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. Food Chem. Toxicol. 46, S1–S71. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.085>.
- Benovit, S.C., Silva, L.L., Salbego, J., et al., 2015. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. An. Acad. Bras. Cienc. 87, 1675–1689. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140223>.
- Bianchini, A.E., Garlet, Q.I., da Cunha, J.A., et al., 2017. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. Braz. J. Med. Biol. Res. 50, e6346. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176346>.
- Chanotiya, C.S., Yadav, A., 2009. Enantiomeric composition of (3R)-(-)- and (3S)-(+)-linalool in various essential oils of Indian origin by enantioselective capillary gas chromatography-flame ionization and mass spectrometry detection methods. Nat. Prod. Commun. 4, 563–566.
- Cunha, M.A., Maikon, F., Barros, C., et al., 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture 306, 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>.
- Cunha, M.A., da Silva, B.F., Delunardo, F.A.C., et al., 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. Neotropical Ichthyol. 9, 683–688. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252011000300022>.
- Fan, J., Lannoy, D., 2014. Pharmacokinetics. Biochem. Pharmacol. 87, 93–120. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>.
- Friedl, S.M., Oedendorfer, K., Kitzler, S., et al., 2010. Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC/MS analysis for the quantification of (-)-linalool in

- human whole blood samples. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1447–1452.
- Garlet, Q.L., Pires, L.C., Silva, D.T., et al., 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49, e4872. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154872>.
- Gomes, D.P., Chaves, B.W., Becker, A.G., 2011. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish. *Rhamdia quelen* 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02864.x>.
- Gomulka, P., Fornal, E., Berecka, B., et al., 2015. Pharmacokinetics of propofol in rainbow trout following bath exposure. *Pol. J. Vet. Sci.* 18, 147–152. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0019>.
- Guénette, S.A., Uhland, F.C., Hélie, P., et al., 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266, 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>.
- Hansen, M.K., Nymo, U., Horsberg, T.E., 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of metamidol in turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26, 95–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00454.x>.
- Heldwein, C.G.G., Silva, L.L.L., Reckziegel, P., et al., 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 436–443. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500052>.
- Heldwein, C.G., Silva, L. de L., Gai, E.Z., et al., 2014. S-(+)-linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.* 41, 621–629. <https://doi.org/10.1111/vaa.12146>.
- Hohlenwerger, J.C., Copatti, E.C., Cedraz, A., et al., 2016. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 49, 119–126. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1123869>.
- Hoseini, S.M., Mirghaed, T.A., Yousefi, M., 2018. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12245>.
- Jumping, L., Jian, L.I., Fazhen, Z., 2012. Pharmacokinetics and tissue behavior of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in turbot *Scophthalmus maximus* at two water temperatures. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 30, 644–653. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1228-2>.
- Ludbrook, G.L., Visco, E., Lam, A.M., 2002. Relation between brain concentrations, electroencephalogram, middle cerebral artery blood flow velocity, and cerebral oxygen extraction during induction of anesthesia. *Anesthesiology* 97, 1363–1370.
- Manayi, A., Nabavi, S.M., Daglia, M., Jafari, S., 2016. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacol. Rep.* 68, 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.014>.
- Mazandarani, M., Hoseini, S.M., Ghomshani, M.D., 2017. Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation. *Aquac. Res.* 48 (12), 5775–5781. <https://doi.org/10.1111/are.13400>.
- Meinertz, J.R., Greseth, S.L., Schreier, T.M., et al., 2006. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. *Aquaculture* 254, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.028>.
- Mirghaed, A.T., Ghelichpour, M., Hoseini, S.M., 2016. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - comparison with eugenol. *Aquaculture* 464, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.028>.
- Neiffer, D.L., Stamper, M.A., 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J.* 50, 343–360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>.
- NIST, 2008. National Institute of Standards and Technology: Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). Gaithersburg, USA.
- O’Brown, N.M., Pfau, S.J., Gu, C., 2018. Bridging barriers: a comparative look at the blood-brain barrier across organisms. *Genes Dev.* 32, 466–478. <https://doi.org/10.1101/gad.309823.117>.
- Oda, A., Messenger, K.M., Carbajal, L., et al., 2018. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects in koi carp (*Cyprinus carpio*) following immersion in propofol. *Vet. Anaesth. Analg.* 45, 529–538. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2018.02.005>.
- Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., et al., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Lioponea vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 155, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003>.
- Passos, C.S., Arbo, M.D., Rates, S.M.K., Poser, G.L., 2009. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Rev. Bras. Vet.* 19, 140–149. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100024>.
- Priborsky, J., Velisek, J., 2018. A review of three commonly used fish anesthetics. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 26, 417–442. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1442812>.
- Shi, F., Zhao, Y., Firepong, C.K., Xu, X., 2016. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers. *Pharm. Biol.* 54, 2320–2328. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1155630>.
- Shinoda, W., 2016. Permeability across lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1858, 2254–2265. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.03.032>.
- Silva, L.L., Balconi, L.S., Gressler, L.T., et al., 2017. S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 203–212. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150643>.
- Simões, L.N., Medeiros, L., Heinzmann, B.M., et al., 2017. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 50, 205–217. <https://doi.org/10.1080/10236244.2017.1362317>.
- Souza, C.F., Baldissera, M.D., Silva, L.L., et al., 2018. Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish? *Aquaculture* 486, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.025>.
- Stehly, G.R., Meinertz, J.R., Gingerich, W.H., 1998. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 21, 121–127.
- Storpirtis, S., Gai, M.N., de Campos, D.R., Gonçalves, J.E., 2011. Farmacocinética Básica e Aplicada. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Sugawara, Y., Hara, C., Tamura, K., et al., 1998. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool. *Anal. Chim. Acta* 365, 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00639-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00639-9).
- Toni, C., Martos-Sitcha, J.A., Baldisserotto, B., et al., 2015. Sedative effect of 2-phenox-yethanol and essential oil of *Lippia alba* on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Res. Vet. Sci.* 103, 20–27.
- Toutain, P.L., Boustquet-Melou, A., 2004. Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 427–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x>.
- Upton, R.N., 2007. Cerebral uptake of drugs in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 695–701. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04649.x>.
- Vergneau-Grosset, C., 2017. Evidence-based advances in aquatic animal medicine. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* 20, 839–856. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.04.003>.
- Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Ghelichpour, M., 2019. Change in blood stress and antioxidant markers and hydromineral balance of common carp (*Cyprinus carpio*) anaesthetized with citronellal and linalool: comparison with eugenol. *Aquac. Res.* <https://doi.org/10.1111/are.14007>.
- Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 201–218. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1>.
- Zeideh, I., Najjar, A., Karaman, R., et al., 2018. Strategies for enhancing the permeation of CNS-active drugs through the blood-brain barrier: a review. *Molecules* 23, 1289. <https://doi.org/10.3390/molecules23061289>.
- Zhao, D.H., Ke, C.L., Liu, Q., et al., 2017. Elimination kinetics of eugenol in grass carp in a simulated transportation setting. *BMC Vet. Res.* 13, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1273-3>.

4.2 ARTIGO 2

Aquaculture 529 (2020) 735637



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Tissue distribution and elimination of *S*-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*)



Adriane Erbice Bianchini^a, Patrícia Rodrigues^a, Luisa Barichello Barbosa^b,
Guerino Bandeira Junior^a, Carine de Freitas Souza^c, Berta Maria Heinzmann^b,
Bernardo Baldisserotto^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratório de Extrativos Vegetais, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Anesthetics
Fillet
Natural product
Residues

ABSTRACT

There are indications that *S*-(+)-linalool is a viable anesthetic for use in aquaculture, but to date there is little scientific data on its pharmacokinetic profile. Therefore, we determined *S*-(+)-linalool distribution and depletion in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Fish were submitted to an immersion bath with *S*-(+)-linalool (153 mg/L) for up to 30 min; afterwards, were transferred to anesthetic-free aquaria for recovery. Tissues (kidney, liver, muscle and gills) were collected after 0.03, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 and 24 h after onset of *S*-(+)-linalool exposure. Another group of fish was transferred to individual aquaria after anesthesia for recovery for up to 48 h to determine the excretion rate. Water samples were collected after 0.5, 1, 2, 6, 24 and 48 h of recovery; after each collection, the water was renewed. *S*-(+)-Linalool could be quantified in all tissue samples up to 12 h and in water up to 24 h. The presence of volatile metabolites in concentrations detectable by the method used was not verified in any of the samples. The maximum concentration (C_{max}) was higher in the kidney, followed by liver, gills and muscle (143.15, 110.03, 54.49 and 20.76 $\mu\text{g/g}$, respectively), at 0.5 h (T_{max}). Non-compartmental analysis revealed that *S*-(+)-linalool elimination is faster in the liver, followed by kidney, gills and muscle according to elimination constant (K_{el} : 0.20, 0.10, 0.07 and 0.06 /h, respectively) and terminal half-life ($T_{1/2\beta}$: 3.45, 6.30, 9.96 and 11.04 h, respectively). The estimated areas under the curve from zero to 12 h (AUC_{0-12}) and to infinity ($AUC_{0-\infty}$) were: 304.7 and 382.7 $\mu\text{g/g h}$ (kidney), 228.23 and 242.76 $\mu\text{g/g h}$ (liver), 130.03 and 207.58 $\mu\text{g/g h}$ (gills), and 54.38 and 93.49 $\mu\text{g/g h}$ (muscle), respectively. Around 68% of *S*-(+)-linalool was excreted in the first 2 h of recovery. Excretion rates after 0.5, 1, 2, 6 and 24 h of recovery were 85.10 ± 9.83 , 52.45 ± 5.01 , 22.67 ± 2.10 , 5.62 ± 0.55 and 1.63 ± 0.05 mg/kg h, respectively. In general, silver catfish had no difficulty in eliminating *S*-(+)-linalool. Although elimination of *S*-(+)-linalool from the muscle is slower than from other tissues, it is not a limiting factor for its use, since the residual concentration in the muscle after 12 h is much lower than the accepted daily intake (500 $\mu\text{g/kg bw}$) recommended for this compound. Therefore, we recommend continuing studies with this phytochemical for possible approval as an anesthetic for aquaculture.

1. Introduction

S-(+)-Linalool is a naturally occurring monoterpenoid and can be obtained from the essential oils of various aromatic plants including *Lippia alba* (Gomes et al., 2019; Heldwein et al., 2012). *S*-(+)-linalool, as well as the *R*-(-) enantiomer, performs many biological activities, but both are mainly described as nervous system depressants in humans and other mammals (Katsuyama et al., 2015; Linck et al., 2009). These

properties have aroused interest in this phytochemical for sedation and anesthesia in fish species (Baldisserotto et al., 2018; Heldwein et al., 2014; Mirghaed et al., 2016). *S*-(+)-linalool produces sedation/anesthesia in silver catfish (*Rhamdia quelen*) by an unknown mechanism of action and without side effects, as well as quick recovery (Bianchini et al., 2017; Heldwein et al., 2014). In this context, *S*-(+)-linalool can be seen as a viable alternative for fish sedation/anesthesia; therefore, the development of research that aims to define the pharmacokinetic

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105 – 900 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: bbaldisserotto@hotmail.com (B. Baldisserotto).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735637>

Received 9 April 2020; Received in revised form 16 June 2020; Accepted 16 June 2020

Available online 23 June 2020

0044-8486/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

profile of *S*-(+)-linalool in fish is justified.

Pharmacokinetic studies are a necessary tool for characterizing the safety profile of new molecules. Considering that the use of a product/drug in food-producing animals may leave residues in the final product, the pharmacokinetic profile is useful for determining the drug withdrawal time, in order to ensure consumer food safety (Xu et al., 2020; Yang et al., 2020). Withdrawal time is estimated based on the maximum residue limit (MRL) determined for each drug (FAO, 2018). *S*-(+)-linalool does not have an established MRL, but as a food additive (flavoring agent), its recommended acceptable daily intake (ADI) is 500 µg/kg bw (JECFA, 1998).

The pharmacokinetic profile of anesthetics such as isoeugenol, metomidate, benzocaine, tricaine methanesulfonate (MS-222), 2-phenoxyethanol, propofol, thymol and eugenol has already been described in some fish species (Gomulka et al., 2015; Guénette et al., 2007; Hansen et al., 2003; Huang et al., 2017; Kiessling et al., 2009; Meinertz et al., 2006, 1996; Meinertz and Hess, 2014; Meinertz and Schreier, 2009; Oda et al., 2018; Tago et al., 2017; Ventura et al., 2019). Of these, only isoeugenol and the last two are natural compounds. We recently described the pharmacokinetic profile of *S*-(+)-linalool in the plasma and brain of silver catfish, and this compound has rapid absorption and elimination, based on the pharmacokinetic parameters in plasma. However, in the brain, the elimination profile of *S*-(+)-linalool is slower, despite it being an anesthetic with rapid recovery (Bianchini et al., 2019). Furthermore, there is a lack of studies on the distribution and elimination of linalool in other fish organs. Therefore, our objective in this study is to characterize the distribution of *S*-(+)-linalool and depletion of its residues in other important tissues of silver catfish (kidney, liver, gills and muscle). We also propose to evaluate the excretion of *S*-(+)-linalool in the recovery water.

2. Materials and methods

2.1. *S*-(+)-Linalool isolation

S-(+)-Linalool was isolated from *L. alba* essential oil according to Bianchini et al. (2019). Only fractions with purity $\geq 96\%$ were used. Other fractions (3.0 g) with lower purity were grouped and subjected to further separation in a chromatography column (70 × 4.5 cm) containing silica gel 60 as the stationary phase (300 g, 230–400 mesh; Merck, Darmstadt, Germany), and hexane:acetone (95:5 v/v) as the mobile phase. Flow of 2.0 mL/min was maintained until fraction 80 (15 mL), after which the flow was reduced to 1.5 mL/min. The collected fractions were monitored by thin layer chromatography (silica gel F254, hexane:acetone 95:5 v/v, detection: anisaldehyde-H₂SO₄) and pooled according to their chromatographic profiles. After that, fractions were concentrated under reduced pressure (40 °C) and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) according to Bianchini et al. (2019).

2.2. Experiment 1

2.2.1. Animals

Silver catfish (140.62 ± 3.81 g and 31.70 ± 0.41 cm) were obtained and acclimated as described by Bianchini et al. (2019).

2.2.2. Experimental design

Animals were exposed to an immersion bath containing *S*-(+)-linalool (153 mg/L, density: 0.85 g/mL) for a maximum time of 30 min. The concentration of 153 mg/L was described by Heldwein et al. (2014) as anesthetic for the species. The exposure time of 30 min was chosen through a pilot study that defined it as the maximum exposure time without animal mortality (Bianchini et al., 2019). Afterwards, the animals were transferred to an anesthetic-free aquarium for recovery according to Gomes et al. (2011).

After euthanasia by spinal cord transection, tissues (kidney, liver,

muscle and gills) were collected 0.03, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 and 24 h after onset of *S*-(+)-linalool exposure ($n = 6$ per time point, each fish sampled once, total = 54 fish). Animals sampled after 0.5 h were placed in an anesthetic-free aquarium for collection at the remaining time points (1, 1.5, 2, 4, 8, 12 and 24 h). All samples were stored at –80 °C until extraction and chemical analysis.

2.3. Experiment 2

2.3.1. Animals

Silver catfish (164.36 ± 2.65 g and 28.23 ± 2.53 cm) were obtained and acclimated as described by Bianchini et al. (2019) and with the following water quality parameters throughout the acclimation and experimental periods: 21.80 ± 0.28 °C, pH 7.43 ± 0.13, dissolved oxygen 7.78 ± 0.09 mg/L, total ammonia 0.29 ± 0.06 mg/L and nitrite 0.25 ± 0.0035 mg/L. Animals were fed to satiety with commercial feed (42% crude protein; Supra-Alisul Alimentos®, Cruz Alta, Brazil) once daily and fasted 24 h prior to experiments.

2.3.2. Experimental design

Animals ($n = 6$) were anesthetized for 30 min in an aquarium containing *S*-(+)-linalool (153 mg/L). Afterwards, the animals were placed in other aquaria with circulating water for 2 min to remove the *S*-(+)-linalool present on their surface. Subsequently, each animal was transferred separately to another aquarium containing 2 L of water where they were kept until the end of the experiment (48 h). Samples of the recovery water were collected after 0.5, 1.0, 2.0, 6.0, 24.0 and 48.0 h of recovery. After each collection time, the remaining water in the aquarium was completely renewed. Water samples were stored at –20 °C until extraction and chromatographic analysis.

2.4. Ethical approval

Both protocols (experiments 1 and 2) were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of UFSC (number 8623130318) and met the guidelines of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brazil).

2.5. *S*-(+)-Linalool extraction from tissues

Tissue (300 mg) was homogenized (homogenizer Dremel 4000®) with 500 µL methanol (90%) (liver and kidney) or 500 µL saline (0.9%) (gills and muscle). The choice of saline or methanol for each tissue was based on the standardization tests performed previously (pilot test). After that, 1 mL of hexane (analytical grade) was added and the samples were vortexed (30 s) and centrifuged at 10,000 ×g (15000R centrifuge, Cientec®, BR) at –4 °C for 5 min. The supernatant (hexane) was removed and the centrifugation process repeated with the addition of another 500 µL hexane. Both supernatants were grouped, filtered through a polytetrafluoroethylene membrane (PTFE, 0.45 µm), and 50 µg/mL thymol (density 0.96 g/mL, 98% purity; Sigma–Aldrich, São Paulo, Brazil) was added as an internal standard (IS).

2.6. *S*-(+)-Linalool extraction from water

S-(+)-Linalool was extracted from water by adding 1 mL hexane (analytical grade) to 2 mL of the water. After that, the sample was vortexed (30 s) and allowed to stand for spontaneous separation of the supernatant (hexane), which subsequently was filtered through a PTFE membrane (0.45 µm). Hexane (500 µL) together with IS (thymol 500 µg/mL) was subjected to chromatographic analysis.

To calculate *S*-(+)-linalool excretion as a function of time (48 h), the values quantified in water were subsequently applied to the following equation: $ExLin = ([Lin] \times V) / (T \times W)$, where: [Lin] is the *S*-(+)-linalool concentration in water; V is the bath volume in liters ($V = 2$ L); and T is the time of the excretion in hours, adapted from

Table 1
Validation of the analytical method in the different matrices.

Matrix	r^2	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Precision (CV%)	Recovery (%)
Kidney	≥ 0.99	0.052	0.153	6.2 (1.9–12.9)	76.3 (75.2–77.4)
Liver	≥ 0.99	0.076	0.232	6.0 (1.3–11.3)	85.4 (79.9–90.8)
Muscle	≥ 0.99	0.113	0.341	7.6 (2.9–11.8)	101.9 (97.5–106.2)
Gills	≥ 0.99	0.006	0.066	8.2 (2.3–13.7)	102.5 (98.2–102.5)
Water	≥ 0.99	0.049	0.151	4.6 (2.2–7.0)	98.7 (96.2–100.7)

Curve working range = 0.5–500 $\mu\text{g/mL}$; r^2 = correlation coefficient; LD = limit of detection ($\mu\text{g/mL}$); LQ = limit of quantification ($\mu\text{g/mL}$).

Gonzalez et al. (1998).

2.7. Validation of the analytical method

Tissues (kidney, liver, muscle or gills) or water were fortified with known concentrations of *S*-(+)-linalool (0.1–500 $\mu\text{g/mL}$), in triplicate, and subsequently subjected to the extraction procedure described in the sections 2.5 (tissues) and 2.6 (water). The analytical curve was determined by the linear regression method and validated according to its correlation coefficient (R^2), Precision (coefficient of variation, CV%), recovery (%) and limits of detection (LD) and quantification (LQ) were also estimated (Table 1). The water used for the analytical curves was collected from a control fish (free from anesthesia) that was kept under the same conditions as the test animals for 48 h.

2.8. *S*-(+)-Linalool quantification

After the extraction phase, quantitative analyses of *S*-(+)-linalool in the tissue and water were performed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC–FID) according to Bianchini et al. (2019).

2.9. Pharmacokinetic parameters

The pharmacokinetic parameters of *S*-(+)-linalool in tissues were calculated using non-compartmental methods (Storpiertis et al., 2011). Briefly, the elimination constant (K_{el}), terminal half-life ($T_{1/2\beta}$), area under the curve from time 0 until time t (AUC_{0-t}) and from 0 to infinity ($AUC_{0-\infty}$), maximum concentration (C_{max}) and maximum time (T_{max}) were estimated as described by Bianchini et al. (2019).

2.10. Statistical analysis

Homogeneity of variance was determined with the Kolmogorov–Smirnov test. Data were then evaluated by one-way ANOVA post-hoc Tukey or Kruskal–Wallis post-hoc Dunn test, when appropriate. The statistical tests were performed using GraphPad Prism software version 6.0 (San Diego, CA, USA), and the minimum significance level for all analyses was set at $p < .05$. Data are reported as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. *S*-(+)-Linalool in the tissues

Volatile linalool metabolites were not present above the detection limits in any of the tissue or water samples. For this statement, the chromatographic profiles of blank samples and calibration curves were compared with tissue and water experimental samples at all times analyzed.

It was possible to quantify *S*-(+)-linalool in all tissues up to 12 h after anesthesia. In gills, signs of linalool were detected at 24 h, but the signal was too low to quantify. *S*-(+)-Linalool concentrations in the tissues did not differ statistically at the beginning of anesthesia (0.03 h), with the exception of muscle, in which the *S*-(+)-linalool concentration was lower than in the other tissues. However, at the end of anesthesia

(0.5 h), all tissues differed from each other; the kidney tissue had the highest concentration of linalool ($143.2 \pm 10.69 \mu\text{g/g}$), followed by liver ($110.0 \pm 6.76 \mu\text{g/g}$), gills ($54.49 \pm 6.20 \mu\text{g/g}$) and muscle ($20.76 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$). After the end of anesthesia, the *S*-(+)-linalool concentration in the tissues reduced considerably. At 4 h, *S*-(+)-linalool concentrations increased considerably in kidney and liver, differing statistically from those in gill and muscle; however, at 8 h the *S*-(+)-linalool concentration in these tissues decreased again. At the last quantifiable time point (12h), the *S*-(+)-linalool concentration in the kidney ($8.54 \pm 1.68 \mu\text{g/g}$) was significantly higher than that in liver ($2.91 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$) and muscle ($2.46 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$), but did not differ from that in the gills ($5.39 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$) (Fig. 1 and Table 2).

3.2. *S*-(+)-Linalool excretion in water

The rate of *S*-(+)-linalool excretion after 0.5, 1, 2, 6 and 24 h of recovery was 85.10 ± 9.83 , 52.45 ± 5.01 , 22.67 ± 2.10 , 5.62 ± 0.55 and $1.63 \pm 0.05 \text{ mg/kg h}$, respectively. *S*-(+)-Linalool was not detected after 48 h by the method used in this study. *S*-(+)-Linalool elimination can be represented by an exponential non-linear regression curve (two-phase decay type), described by the equation: $y = 0.7525 + 130.42^{(-1.12x)} + 10.81^{(-0.13x)}$, $r^2 = 0.88$, where y = *S*-(+)-linalool excretion in mg/kg h , and x = time (h) (Fig. 2).

3.3. Pharmacokinetic parameters

C_{max} in all tissues was reached in 0.5 h (T_{max}), the maximum anesthetic exposure time. Kidney tissue had the highest C_{max} ($143.15 \mu\text{g/g}$), followed by liver ($110.03 \mu\text{g/g}$), gills ($54.49 \mu\text{g/g}$) and muscle ($20.76 \mu\text{g/g}$). The K_{el} of *S*-(+)-linalool was higher in liver (0.20 /h), which resulted in a shorter $T_{1/2\beta}$ (3.45 h) compared to other tissues. In contrast, *S*-(+)-linalool $T_{1/2\beta}$ was longer in muscle (11.04 h) than in other tissues. The AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ estimated for kidney (304.7 and

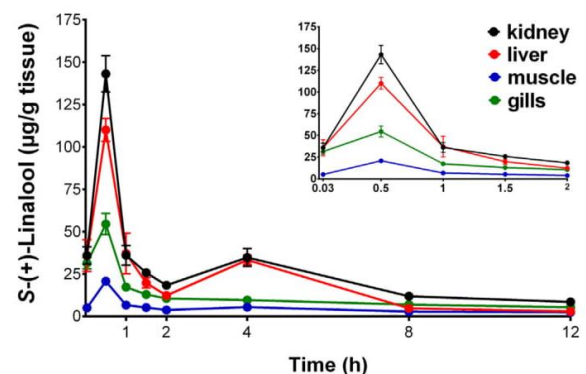


Fig. 1. *S*-(+)-Linalool concentration versus time (h) in tissues (kidney, liver, muscle and gills) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) ($n = 6$). Statistical differences were determined by one-way ANOVA post-hoc Tukey or Kruskal–Wallis post-hoc Dunn test ($p < .05$).

Table 2

S-(+)-Linalool concentration versus time (h) in tissues (kidney, liver, muscle and gills) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L). Time of anesthesia was up to 0.5 h; afterwards, fish were placed in anesthetic-free water for recovery.

Time (h)	Tissues ($\mu\text{g/g}$)			
	Kidney	Liver	Muscle	Gills
0.03	35.95 \pm 5.10 ^a	35.73 \pm 9.21 ^a	4.97 \pm 0.68 ^b	31.43 \pm 3.25 ^a
0.5	143.20 \pm 10.69 ^a	110.0 \pm 6.76 ^b	20.76 \pm 0.54 ^d	54.49 \pm 6.21 ^c
1.0	36.10 \pm 5.73 ^a	37.09 \pm 11.91 ^a	6.66 \pm 0.47 ^b	17.27 \pm 1.21 ^{ab}
1.5	25.74 \pm 1.92 ^a	19.76 \pm 3.01 ^{ab}	5.21 \pm 0.44 ^c	12.91 \pm 0.69 ^b
2	18.33 \pm 2.05 ^a	12.31 \pm 0.41 ^b	3.77 \pm 0.31 ^c	10.57 \pm 0.75 ^b
4	34.79 \pm 5.27 ^a	33.29 \pm 2.77 ^a	5.43 \pm 0.31 ^b	9.65 \pm 0.52 ^b
8	11.87 \pm 0.83 ^a	4.77 \pm 1.06 ^{ab}	2.83 \pm 0.13 ^b	6.94 \pm 0.30 ^{ab}
12	8.54 \pm 1.67 ^a	2.91 \pm 0.51 ^b	2.46 \pm 0.07 ^b	5.39 \pm 0.08 ^{ab}
24	ND	ND	ND	< LQ

ND = not detected; < LQ = less than the limit of quantification.

Statistical differences were determined by one-way ANOVA post-hoc Tukey or Kruskal–Wallis post-hoc Dunn test ($p < .05$, $n = 6$).

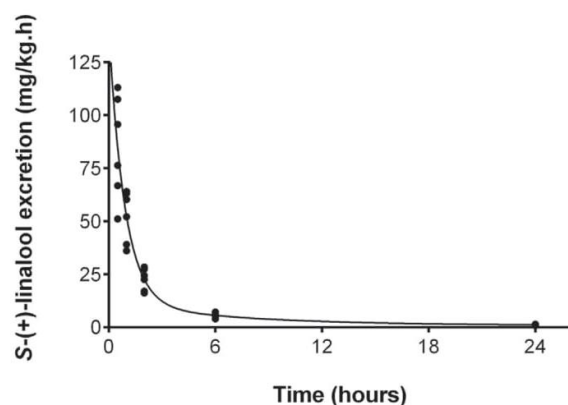


Fig. 2. S-(+)-Linalool excretion in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath (153 mg/L) ($n = 6$).

Table 3

Pharmacokinetic parameters of S-(+)-linalool (153 mg/L) in the tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath.

Pharmacokinetic parameters	Kidney	Liver	Muscle	Gills
T_{\max} (h)	0.50	0.50	0.50	0.50
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$)	143.15	110.03	20.76	54.49
$T_{1/2\beta}$ (h)	6.30	3.45	11.04	9.96
K_{el} (per h)	0.10	0.20	0.06	0.07
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/g h}$)	304.7	228.23	54.38	130.03
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/g h}$)	382.7	242.76	93.49	207.58

T_{\max} = maximum time; C_{\max} = maximum concentration; $T_{1/2\beta}$ = terminal half-life; K_{el} = elimination constant; AUC = area under the curve from time zero to 12 h (AUC_{0-t}) or to infinity ($AUC_{0-\infty}$).

382.7 $\mu\text{g/g h}$) were larger than for the other tissues (Table 3).

4. Discussion

Pharmacokinetic modeling is an indispensable tool for the development of pharmacology because the therapeutic success of a drug depends in part on its pharmacokinetic behavior (Visser, 2018). With this purpose, the present study provides information about the tissue distribution and elimination of S-(+)-linalool in fish anesthesia. Knowing the pharmacokinetic profile of this phytochemical is crucial for its possible application in aquaculture. The pharmacokinetic profile of a drug can be estimated by employing different mathematical models (Fan and Lannoy, 2014). In the current study, a non-compartmental

model was used, which is in agreement with other studies that also used the immersion bath route of administration (Bianchini et al., 2019; Gomułka et al., 2015; Guénette et al., 2007; Vorbach et al., 2019; Zhao et al., 2017).

The distribution of drugs, as other pharmacokinetic processes, is influenced by factors related to the organism and the physicochemical properties of the drug (Storpirtis et al., 2011). S-(+)-Linalool was detected in all silver catfish tissues in the first minutes of anesthesia, but with greater abundance in kidney, liver and gills compared to muscle, probably due to the higher blood perfusion in these tissues (Takai et al., 2012). However, the C_{\max} reached at 0.5 h (T_{\max}) was different between all tissues in the order of magnitude kidney > liver > gills > muscle. Kidney (143.15 $\mu\text{g/mL}$) and liver (110.03 $\mu\text{g/mL}$) C_{\max} were closest to that of plasma (129.33 $\mu\text{g/mL}$) of silver catfish anesthetized with S-(+)-linalool under the same experimental conditions (Bianchini et al., 2019). These tissues and the blood correspond to the central compartment; therefore, they usually reach equilibrium with each other (Toutain and Bousquet-Melou, 2004).

The concentration–time curves for S-(+)-linalool in the tissues as well as the parameters C_{\max} and AUC show the wide distribution of S-(+)-linalool to renal and hepatic tissue. This profile may be related to the physiological function of these tissues, since they are important organs in xenobiotic metabolism and excretion (Xu et al., 2020). This distribution profile is similar to that of antimicrobials such as oxytetracycline in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Zhang and Li, 2007), enrofloxacin in turbot (*Scophthalmus maximus*) (Liang et al., 2012) and common carp (*Cyprinus carpio*) (Chen et al., 2019), and norfloxacin in Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and black sea bream (*Sparus macrocephalus*) (Wang et al., 2008), after oral administration. It is known that the gills also participate in this process (Evans et al., 2005); however, linalool showed less affinity for this tissue (lower C_{\max} and AUC) compared to the liver and kidney, and also to plasma (Bianchini et al., 2019). In this sense, the gills appear to play only a role of exchange between the external (water) and internal (blood) environments, while in the kidney and liver there is greater bioaccumulation of the drug.

The $T_{1/2\beta}$ is an elimination parameter that can be used, among other purposes, to estimate the degree of drug accumulation (Toutain and Bousquet-Melou, 2004). In the liver and kidney, the $T_{1/2\beta}$ of S-(+)-linalool was short, and close to that of plasma (Bianchini et al., 2019), being more prolonged in the gills and muscle, indicating that its elimination occurs more slowly in these tissues. Similar results have been reported in grass carp in which oxytetracycline concentrations decreased rapidly in kidney and liver, while in muscle lower concentrations decreased slowly. The authors attributed this pharmacokinetic behavior to the rate of blood tissue perfusion (Zhang and Li, 2007). The lower blood perfusion in muscle tissue can make it difficult to eliminate a drug, even if it is a small fraction, as is the case for S-

(+)-linalool in silver catfish muscle. However, this theory does not explain the high $T_{1/2\beta}$ in the gills, as they are also a highly perfused tissue (Evans et al., 2005). In this case, our hypothesis is that, as there is evidence that gills participate in part of the elimination of anesthetics in fish (Kiessling et al., 2009), the S-(+)-linalool from other tissues and extracellular spaces returns to the gills through blood circulation to be eliminated, which leads to the slow decay of S-(+)-linalool in the branchial tissue. Furthermore, it is known that volatile compounds are eliminated extensively by organs responsible for gas exchange (Kohlert et al., 2000).

Registered veterinary products used in food-producing animals have their withdrawal times estimated based on their MLRs (FAO, 2018). S-(+)-Linalool has no stipulated MLR; however, it is approved as a food additive (flavoring agent) and its ADI was fixed at 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw (JECFA, 1998). Veterinary drug MLRs are estimated based on the ADI and assuming the possibility of ingesting the drug from other sources (if applicable). MLR of isoeugenol (food additive) in fish was calculated considering only 40% of the ADI value, due to its ingestion by other sources (EMA, 2011). Assuming this premise, S-(+)-linalool intake from veterinary drug in fish could not exceed 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw (60 kg person), and consumption of 300 g (daily consumption used by EMA) of silver catfish after anesthesia (20.76 \pm 0.54 $\mu\text{g}/\text{g}$ in muscle) would correspond to an intake of 103.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw. It is not possible to determine the withdrawal time for S-(+)-linalool with these data only, mainly due to the absence of pre-established MLR, but these first findings on the S-(+)-linalool depletion in silver catfish prove that its residual in the muscle is below the limits of ADI at any time after anesthesia.

The elimination of S-(+)-linalool ($T_{1/2\beta}$) from the muscle is similar to that of eugenol (10.27 h) in grass carp after transport simulation (Zhao et al., 2017), but it is greater than that of MS-222, isoeugenol, benzocaine, 2-phenoxyethanol and eugenol (44–147 min) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Huang et al., 2017). We must highlight that factors such as dosage (concentration) regime, temperature, pH and intra-species differences can alter S-(+)-linalool elimination kinetics in fish; therefore, the extrapolation of results must be done with caution (VICH, 2019).

Volatile S-(+)-linalool metabolites above the LD were not found in any of the tissues analyzed, including water. The same was observed in the plasma and brain of silver catfish anesthetized with S-(+)-linalool (Bianchini et al., 2019). Even with these findings, we cannot exclude the possibility of S-(+)-linalool undergoing metabolization in this species. Firstly, metabolites may be present below the LD, even if they are at very low concentrations, and without pharmacological importance. We should also consider that the chromatographic method used in this study (gas chromatography) is capable of detecting only volatile molecules. In addition, studies in rodents have detected the presence of conjugated metabolites of linalool (racemic mixture) in bile (Parke et al., 1974) and urine (Chadha and Madyastha, 1984). To clarify this issue, future studies with the application of other methodologies are important. Liquid chromatography systems such as high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) can be used for the detection and quantification of non-volatile compounds (Chen et al., 2019; Yang et al., 2020). According to Schlechtriem et al. (2016), liquid scintillation counting (LSC) method is effective for detection of metabolites of different chemical species in fish tissues and excretion products.

An increase in tissue concentrations of S-(+)-linalool (kidney, liver and slightly in the muscle) was observed during the recovery period (4 h). In crucian carp (*Carassius auratus*) the occurrence of a double peak in tissues after florfenicol administration (oral and intramuscular) was attributed to possible enterohepatic recirculation (Sun et al., 2010). Knowing that linalool enterohepatic recirculation occurs in rodents (Parke et al., 1974), this may be a viable hypothesis. In this case, the S-(+)-linalool excreted via bile in the intestine (conjugated form) could be decoupled by action of intestinal enzymes and absorbed again in its

active form (Fan and Lannoy, 2014). However, presence of a double peak in the tissues is usually noticed along with double peaks in the plasma due to the drugs redistribution (Huang et al., 2019), fact not observed with S-(+)-linalool in silver catfish (Bianchini et al., 2019). In this context, complementary studies are needed to strengthen this hypothesis.

Excretion of S-(+)-linalool in the water was significant mainly in the first 2 h of recovery, making up 68% of the total excreted within 24 h. This indicates that the silver catfish has no major difficulties in quickly eliminating this phytochemical. The S-(+)-linalool present in the water comes from different excretion routes: renal and branchial excretion and possibly some contribution through the skin and feces. Therefore, S-(+)-linalool quantification in water was possible for longer than in tissues (> 12 h) because residual quantities continued to be eliminated. The methodology used does not allow us to determine which of the excretion routes is most significant. Although S-(+)-linalool distribution in the kidney is more abundant than in the gills (higher C_{max} and $\text{AUC}_{0-t/0-\infty}$), S-(+)-linalool concentrations in these tissues are equal after 8 h. In addition, $T_{1/2\beta}$ is 1.58 times longer in the gills compared to the kidney. Therefore, the participation of gills in S-(+)-linalool elimination should not be underestimated. It is known that in *Squalus acanthias*, 95% of MS-222 is eliminated by the gills within 2 h (Stenger and Maren, 1974). In addition, eugenol, benzocaine and MS-222 elimination is faster in *Salmo salar* with artificial ventilation after anesthesia (Kiessling et al., 2009).

5. Conclusion

S-(+)-Linalool is distributed to all the tissues analyzed, with the order of magnitude kidney > liver > gills > muscle. Elimination is slower in muscle compared to the other tissues, but low S-(+)-linalool concentrations are observed in this tissue, and consumption of this muscle (fillet) would result in an intake well below the ADI (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw) established for S-(+)-linalool as a food additive. In addition, on average 68% of S-(+)-linalool excretion in the analyzed period occurred in the first 2 h after anesthesia.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) PhD fellowships to A.E. Bianchini, G. Bandeira Junior and C.F. Souza, and MSc fellowships to P. Rodrigues under “Finance Code 001”. B.M. Heinzmann and B. Baldisserotto received research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). L.B. Barbosa received a research fellowship from Fundo de Inovação Tecnológica.

References

- Baldisserotto, B., Barata, L.E.S., Silva, A.S., et al., 2018. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. *Neotrop. Ichthyol.* 16, e170128. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170128>.
- Bianchini, A.E., Garlet, Q.I., Cunha, J.A., et al., 2017. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 50, e6346. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176346>.
- Bianchini, A.E., Garlet, Q.I., Rodrigues, P., et al., 2019. Pharmacokinetics of S-(+)-linalool in silver catfish (*Rhamdia quelen*) after immersion bath: an anesthetic for aquaculture. *Aquaculture* 506, 302–307. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.03.044>.

- Chadha, A., Madyastha, K.M., 1984. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica* 14, 365–374. <https://doi.org/10.3109/00498258409151425>.
- Chen, M., Zhao, H., Wang, Y., et al., 2019. Uptake and depuration of eight fluor-quinolones (FQs) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.075>.
- European Medicines Agency (EMA), 2011. European Public MRL Assessment Report (EPMAR): Isoeugenol (fin fish). Commission Regulation (EU) No 363/2011, O.J.L 100, of 14.04.2011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/iseoeugenol-fin-fish-european-public-mrl-assessment-report-epmar-committee-medical-products_en.pdf.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.
- Fan, J., Lannoy, D., 2014. Pharmacokinetics. *Biochem. Pharmacol.* 87, 93–120. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>.
- FAO, 2018. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018 22. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>.
- Gomes, D.P., Chaves, B.W., Becker, A.G., 2011. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquac. Res.* 42, 878–886. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02864.x>.
- Gomes, A.F., Almeida, M.P., Leite, M.F., et al., 2019. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. *Food Chem.* 273, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.089>.
- Gomulka, P., Fornal, E., Berecka, B., et al., 2015. Pharmacokinetics of propofol in rainbow trout following bath exposure. *Pol. J. Vet. Sci.* 18, 147–152. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0019>.
- Gonzalez, R.J., Wood, C.M., Wilson, R.W., et al., 1998. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. *Physiol. Zool.* 71, 15–22.
- Guénette, S.A., Uhland, F.C., Hélie, P., et al., 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266, 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>.
- Hansen, M.K., Nymoen, U., Horsberg, T.E., 2003. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of metamidate in turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26, 95–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00454.x>.
- Heldwein, C.G.G., Silva, L.L.L., Reckziegel, P., et al., 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 436–443. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500052>.
- Heldwein, C.G., de Silva, L., Gai, E.Z., et al., 2014. S-(+)-linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.* 41, 621–629. <https://doi.org/10.1111/vaa.12146>.
- Huang, S., Xu, J., Wu, J., et al., 2017. Rapid detection of five anesthetics in tilapias by in vivo solid phase microextraction coupling with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 168, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.045>.
- Huang, Y., Chen, X., Wang, H., et al., 2019. Pharmacokinetics of florfenicol in blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*) at two water temperatures with single-dose oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 42, 564–571. <https://doi.org/10.1111/jvp.12773>.
- JECFA, 1998. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). World Health Organization. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4144>.
- Katsuyama, S.K., Towa, A.O., Amio, S.K., et al., 2015. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomed. Res.* 36, 47–54. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.47>.
- Kiessling, A., Johansson, D., Hilde, I., et al., 2009. 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* 286, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.037>.
- Kohlert, C., Van Rensen, I., März, R., et al., 2000. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile Terpenes in animals and humans. *Planta Med.* 66, 495–505. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8616>.
- Liang, J., Li, J., Zhao, F., et al., 2012. Pharmacokinetics and tissue behavior of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in turbot *Scophthalmus maximus* at two water temperatures. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 30, 644–653. <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1228-2>.
- Linck, V., de M., da Silva, A.L., Figueiró, M., et al., 2009. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine* 16, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.001>.
- Meinertz, J.R., Hess, K.R., 2014. Evaluation of analytical techniques to determine AQUIS[®] 20E (eugenol) concentrations in water. *Aquaculture* 418–419, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.033>.
- Meinertz, J.R., Schreier, T.M., 2009. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUIS[®] Exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 296, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.022>.
- Meinertz, J.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., 1996. Pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraarterial dosing. *Aquaculture* 148, 39–48. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01406-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01406-8).
- Meinertz, J.R., Greseth, S.L., Schreier, T.M., et al., 2006. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUISTM at different temperatures, durations, and concentrations. *Aquaculture* 254, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.028>.
- Mirghaed, A.T., Ghelichpour, M., Hoseini, S.M., 2016. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - comparison with eugenol. *Aquaculture* 464, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.028>.
- Oda, A., Messenger, K.M., Carbajal, L., et al., 2018. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects in koi carp (*Cyprinus carpio*) following immersion in propofol. *Vet. Anaesth. Analg.* 45, 529–538. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2018.02.005>.
- Parke, D.V., Rahman, K.H.M.Q.Q., Walker, R., 1974. The absorption, distribution and excretion of linalool in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 2, 612–615. <https://doi.org/10.1042/bst0020612>.
- Schlechtriem, C., Bischof, I., Atorf, C., et al., 2016. Development of a regulatory testing procedure to study the metabolism of pesticides in farmed fish. *Pest Manag. Sci.* 72, 362–370. <https://doi.org/10.1002/ps.4007>.
- Stenger, V., Maren, T., 1974. The pharmacology of MS-222 (ethyl-m-aminobenzoate) in *Squalus acanthias*. *Comp. Gen. Pharmacol.* 5, 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(74\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(74)80005-4).
- Storpiritis, S., Gai, M.N., de Campos, D.R., et al., 2011. Farmacocinética Básica e Aplicada. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Sun, Y.X., Zhao, H.Y., Shan, Q., et al., 2010. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. *Aquaculture* 309, 82–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.042>.
- Tago, A., Yokoyama, S., Ishikawa, M., et al., 2017. Pharmacokinetics of Eugenol in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacult. Soc.* 49, 780–787. <https://doi.org/10.1111/jwas.12438>.
- Takai, N., Tanaka, Y., Inazawa, K., et al., 2012. Quantitative analysis of pharmaceutical drug distribution in multiple organs by imaging mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1549–1556. <https://doi.org/10.1002/rcm.6256>.
- Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2004. Volumes of distribution. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 441–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00602.x>.
- Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2004. Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 427–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x>.
- Ventura, A.S., de Castro Silva, T.S., Zanon, R.B., et al., 2019. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical Piaractus mesopotamicus to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. *Int. Aquat. Res.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40071-019-0215-z>.
- VICH. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, 2019. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing species: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods in aquatic species. <https://www.ema.europa.eu/en/vich-gl57-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-species>.
- Visser, M., 2018. Translating pharmacokinetic and pharmacodynamic data into practice. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 21, 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2018.01.001>.
- Vorbach, B.S., Chandasana, H., Derendorf, H., et al., 2019. Pharmacokinetics of Oxytetracycline in the Giant Danio (*Devario aequipinnatus*) following bath immersion. *Aquaculture* 498, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.027>.
- Wang, Q., Liu, Q., Li, J., et al., 2008. Tissue distribution and elimination of norfloxacin in Japanese sea perch (*Lateolabrus japonicus*) and black sea bream (*Sparus macrocephalus*) following multi-oral administration. *Aquaculture* 278, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.021>.
- Xu, N., Li, M., Chou, W.C., et al., 2020. A physiologically based pharmacokinetic model of doxycycline for predicting tissue residues and withdrawal intervals in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chem. Toxicol.* 137, 111127. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111127>.
- Yang, F., Zhang, C., Wang, H., et al., 2020. Depletion study and withdrawal period calculation of florfenicol in the crucian carp (*Carassius auratus*) following multiple intramuscular injections. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 43, 79–86. <https://doi.org/10.1111/jvp.12822>.
- Zhang, Q., Li, X., 2007. Pharmacokinetics and residue elimination of oxytetracycline in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 272, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.033>.
- Zhao, D.H., Ke, C.L., Liu, Q., et al., 2017. Elimination kinetics of eugenol in grass carp in a simulated transportation setting. *BMC Vet. Res.* 13, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1273-3>.

5 DISCUSSÃO GERAL

Esta tese contempla as primeiras informações sobre a farmacocinética do *S-(+)*-linalol em uma espécie de peixe. O conhecimento do comportamento farmacocinético é necessário para ampliar a probabilidade de sucesso terapêutico, bem como diminuir a ocorrência de efeitos adversos dos fármacos no organismo (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Além destes aspectos, as modelagens farmacocinéticas são ferramentas importantes na aquicultura, visto que auxiliam na estimativa dos tempos de retirada, necessários em produtos de uso veterinário aplicados em animais destinados ao consumo (HUANG et al., 2019; YANG et al., 2020). A aquicultura abrange o cultivo de grande diversidade de espécies as quais compartilham de acentuadas variações anatômicas, fisiológicas e de habitat, por isso pesquisas com abordagens farmacocinética desenvolvidas com diferentes espécies e fármacos usados na aquicultura são necessárias para caracterizar as variabilidades inter-espécies (GAUNT et al., 2013; REN; PAN; WANG, 2016; ROSA et al., 2019). Outra problemática é o número limitado de fármacos aprovados para uso em aquicultura, o que justifica principalmente estudos com novas moléculas. Neste cenário, a pesquisa descrita nesta tese contribui diretamente com o avanço da aquicultura.

Na administração de anestésicos em peixes (e animais de respiração branquial) por banho de imersão a concentração absorvida depende, principalmente, do regime de exposição adotado, ou seja, tempo de exposição e concentração do anestésico. Considerando uma cinética linear, onde a eliminação do fármaco (em dose/concentração terapêutica) é diretamente proporcional à quantidade disponível no organismo, diferenças nos regimes de exposição não alteram a cinética de eliminação (FAN; LANNOY, 2014). Em contrapartida, a concentração residual absoluta no plasma e tecidos pode ser afetada (MEINERTZ et al., 2014b). Portanto, a fim de coletar informações mais abrangentes sobre a farmacocinética do *S-(+)*-linalol foi utilizado um regime de exposição mais longo que o tempo de anestesia (estágio S4). O tempo médio de anestesia do *S-(+)*-linalol (153 mg/L) em jundiás é de 11,8 min (HELDWEIN et al., 2014), mas neste estudo o *S-(+)*-linalol se mostrou seguro (sem mortalidade) com exposição até 30 minutos em concentração anestésica. Todavia, uma concentração para manutenção da anestesia por *S-(+)*-linalol deve ser definida em estudos futuros, bem como a avaliação de protocolos anestésicos em demais espécies de peixes a fim de verificar o regime de exposição mais adequado.

Segundo os dados presentes no artigo 1, o *S-(+)*-linalol é rapidamente absorvido por banho de imersão, com concentração média plasmática de 62,97 µg/mL nos primeiros minutos

de exposição. Além disso, a $C_{\text{máx}}$ plasmática (129.33 $\mu\text{g/mL}$) chegou muito próxima à concentração inicial (153 $\mu\text{g/mL}$) de *S-(+)-linalol* no meio externo. A rápida absorção é característica comum em anestésicos administrados por banho de imersão (GOMUŁKA et al., 2015; HANSEN; NYMOEN; HORSBERG, 2003; ODA et al., 2018). Por esta via as brânquias são a principal forma de entrada dos fármacos na circulação sistêmica (ROSS; ROSS, 2008). Além das brânquias serem especializadas na troca de substâncias entre os meios, o transporte eficaz entre a água e o sangue depende das características de cada substância. Considerando a absorção por difusão através das brânquias, a lipofilicidade ($\log P = 2,75$) e baixo peso molecular (154,25 g/mol) do *S-(+)-linalol* certamente contribuem para sua absorção, pois são diretamente proporcionais à taxa de difusão branquial (BELSITO et al., 2008; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

A distribuição do *S-(+)-linalol* aos principais tecidos (rim, cérebro e fígado) foi tão eficiente quanto sua absorção, o que já era esperado uma vez que estes são órgãos bem perfundidos. O tecido renal e o fígado normalmente são os órgãos que recebem maiores concentrações de fármacos (CHEN et al., 2019). Esse perfil também foi verificado para o MS-222 em uma espécie de tubarão (*Squalus acanthias*) após administração intravenosa (STENGER; MAREN, 1974) e para o eugenol em carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) após banho de imersão em simulação de transporte (ZHAO et al., 2017). No tecido cerebral, onde grande parte dos fármacos têm acesso limitado pela barreira hematoencefálica (BHE) (ZEIADEH et al., 2018), o *S-(+)-linalol* apresentou concentrações próximas ao plasma durante a exposição, com exceção dos 30 min (0,5 h) apenas. Esses dados demonstram que a distribuição do *S-(+)-linalol* ao tecido cerebral não é limitada pela BHE, e corrobora a hipótese de anestesia por mecanismo central.

Na contramão à concentração plasmática, houve decréscimo de *S-(+)-linalol* no cérebro após 20 min de exposição. Este achado se correlaciona com a manutenção da anestesia e ausência de mortalidade, mesmo com a permanência dos animais por um tempo prolongado. No período posterior à $C_{\text{máx}}$ o processo de eliminação é maior que o de absorção (STORPIRTIS et al., 2011). Neste caso, o *S-(+)-linalol* pode ter sido eliminado do cérebro por um mecanismo de transporte ativo. Os transportadores de efluxo são conhecidos por removerem eficientemente xenobióticos do sistema nervoso central de mamíferos (LÖSCHER; POTSCHKA, 2005) e peixes (KENNEDY; TIERNEY; MITTELSTADT, 2014; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014) como mecanismo neuroprotetor. Hipoteticamente, esse mecanismo celular pode ter contribuído para o decréscimo de *S-(+)-linalol* no cérebro durante a exposição.

No primeiro estudo (artigo 1) o *S-(+)*-linalol apresentou rápida eliminação no plasma ($T_{1/2\beta}$ 1,36 h), enquanto uma maior afinidade pelo tecido cerebral resultou em $T_{1/2\beta}$ de 57,27 h. Apesar de $T_{1/2}$ plasmáticas menores que 12 h representarem baixo risco de acúmulo de fármacos (TOUTAIN; BOUSTQUET-MELOU, 2004d), a cinética do *S-(+)*-linalol no cérebro indica concentrações residuais neste tecido por um período mais prolongado. No entanto, essa concentração residual (em torno de 55 $\mu\text{g/g}$) não foi suficiente para manter a anestesia. Devemos salientar que a avaliação dos estágios anestésicos e recuperação dos animais é realizada de acordo com a percepção visual dos avaliadores (GOMES; CHAVES; BECKER, 2011). Neste caso, não podemos descartar possível efeito ansiolítico devido à concentração residual existente no tecido. Em jundiá e peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos à concentração sub-anestésica de *L. alba* (81.64% de *S-(+)*-linalol) foi verificado um efeito ansiolítico do OE em ambas espécies através de software de monitoramento de vídeo ANY-mase® (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018). Portanto, estudos futuros são necessários para avaliar a existência ou não de um efeito ansiolítico, bem como sua duração, para então, podermos discutir e averiguar seus benefícios e/ou malefícios.

O músculo foi o segundo tecido onde o *S-(+)*-linalol apresentou maior $T_{1/2\beta}$ (11,04 h). Esse resultado assemelha-se ao encontrado para o eugenol na carpa capim em um ambiente de transporte simulado (10,27 h) (ZHAO et al., 2017). Por ser o tecido comestível, a depleção de resíduos de fármacos no músculo é um dos pontos relevantes de estudos farmacocinéticos em peixes, pois a velocidade deste processo influencia o período de carência necessário antes do abate para consumo humano (XU et al., 2020; YANG et al., 2020). No entanto, o período de carência depende de outras variáveis como a concentração residual presente no tecido, valor do LMR e a IDA da substância (EMA, 2011). Como discutido no artigo 2, os dados deste estudo não são suficientes para estimar o período de carência do *S-(+)*-linalol no jundiá, principalmente pela inexistência de um LMR pré-estabelecido. No entanto, com base em critérios utilizados pela EMA, as concentrações de *S-(+)*-linalol são inferiores à IDA (500 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal) estabelecida para linalol (como aditivo alimentar) (JECFA, 1998), em qualquer momento da anestesia. Portanto, mesmo que a eliminação do *S-(+)*-linalol seja mais lenta no músculo do que em outros tecidos e no plasma, devemos considerar que a concentração de *S-(+)*-linalol distribuída ao músculo foi menor e dentro dos limites da IDA. Por fim, uma questão que deve ainda ser investigada é se este residual poderia alterar negativamente as características sensoriais do filé. A anestesia com 300 $\mu\text{L/L}$ de OE de *L. alba* não causou alteração no sabor

e odor de filés de jundiás (CUNHA et al., 2010), portanto, suponhamos que o mesmo ocorra com o *S-(+)*-linalol.

Com a quantificação do *S-(+)*-linalol na água foi possível averiguar que a taxa de excreção nos jundiás decaiu rapidamente de $85,10 \pm 9,83$ à $22,67 \pm 2,10$ mg/kg h nas primeiras duas horas de recuperação. A excreção de *S-(+)*-linalol na água neste período compreende à 68% do total excretado ao longo das 24 h. Esses resultados corroboram o perfil de eliminação nos tecidos e plasma em que foi observado rápido decaimento das concentrações nos primeiros momentos de recuperação. A participação de cada via excretora (branquial e renal, principalmente) é desconhecida, pois não foi possível avaliá-las separadamente. Pela curva de concentração e os parâmetros farmacocinéticos percebe-se que o rim é o tecido com maior distribuição de *S-(+)*-linalol. Porém, em *Squalus acanthias* a concentração de MS-222 no rim após 60 min da administração foi 14 vezes maior que nas brânquias, e mesmo assim, a excreção branquial ocorreu com 95% da dose nas primeiras 2 horas (STENGER; MAREN, 1974). Além disso, substâncias lipofílicas sofrem significativa reabsorção nos túbulos renais, com isso, apenas metabólitos mais polares sofrem excreção significativa por esta via, enquanto moléculas apolares são excretadas mais facilmente pelas brânquias (MEINERTZ; GINGERICH; ALLEN, 1991).

Por fim, apesar desta tese contemplar informações importantes para o norteamento do uso de *S-(+)*-linalol em peixes, é necessário a continuidade de pesquisas farmacológicas com esta molécula. O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos é demasiadamente complexo e de alto custo, e por isso demanda, primeiramente, do interesse por parte das indústrias farmacêuticas do setor veterinário (DE LA TORRE; ALBERICIO, 2019). Para isso, o custo de produção é algo que deve ser considerado. Por ser muito utilizada na indústria de perfumaria e na alimentícia, a mistura racêmica de linalol é um produto bem acessível, o que facilitaria sua obtenção (APROTOSOAIIE et al., 2014; OECD, 2002). Contudo, neste caso o processo de separação dos enantiômeros é necessário. O *S-(+)*-linalol está presente em grandes proporções em OEs como o de *L. alba* (46 – 87%) (AYDIN; BARBAS, 2020) e *Coriandrum sativum* (± 62 %) (ÖZEK et al., 2010), por isso também pode ser obtido de fontes naturais.

O *S-(+)*-linalol possui outras características favoráveis para uso em aquicultura que podem elevar o interesse da indústria. Por ser um produto aprovado para uso como aditivo alimentar existem informações de toxicologia já conhecidas em humanos sobre o linalol e seus enantiômeros. Eles são considerados de baixa toxicidade, não sensibilizadores (baixa incidência em desenvolver reação alérgica), não mutagênicos, não carcinogênicos e sem tendência à

bioacumulação em tecidos humanos. Além disso, não oferecem risco de bioacumulação ambiental, pois sofrem rápida biodegradação em meio aquático, solo e na atmosfera (OECD, 2002). Todos esses fatores refletem positivamente na segurança do manipulador e consumidor final, além de fornecer uma opção de anestésico com menor impacto ambiental.

6 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa verificou-se que o *S*-(+)-linalol é rapidamente absorvido quando administrado por banho de imersão, com concentrações significativas no plasma nos primeiros momentos de exposição. Do mesmo modo, após absorção o *S*-(+)-linalol é prontamente distribuído, sendo detectado e quantificado em todos os tecidos analisados desde os primeiros instantes da anestesia. O rim foi o tecido com maior $C_{m\acute{a}x}$ de *S*-(+)-linalol ao final da anestesia. Além disto, concentrações cerebrais de *S*-(+)-linalol próximas às plasmáticas indicam sua facilidade em transpor a BHE e corroboram sua atividade sedativa e anestésica na espécie. De acordo com a $T_{1/2\beta}$ plasmática, o *S*-(+)-linalol tem eliminação rápida no plasma, mas a $T_{1/2\beta}$ estimada para o cérebro indica eliminação mais lenta neste tecido, apesar destas concentrações residuais não terem interferido na recuperação da anestesia que ocorre até 10 min. Segundo a $T_{1/2\beta}$, no músculo, a eliminação de *S*-(+)-linalol é mais lenta que no plasma e em outros tecidos, com exceção do cérebro. Em contrapartida o tecido muscular foi o que apresentou as menores concentrações de *S*-(+)-linalol ao longo da anestesia e no período de recuperação. Neste aspecto, identificamos que a ingestão deste tecido (300 g/pessoa de 60 kg, padrões EMA para estimativa de LMR) em qualquer momento, durante ou após anestesia, resultaria em uma ingestão inferior à IDA (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc) estabelecida para o linalol e seus anantiômeros (*S*-(+) e *R*-(-)-linalol) como aditivo alimentar. Não foram encontrados metabólitos voláteis em concentrações quantificáveis pelo método cromatográfico em nenhuma das amostras analisadas. Referente à excreção, constatou-se que grande parte do *S*-(+)-linalol, 68%, é excretado nas primeiras 2 horas de recuperação, corroborando as concentrações teciduais e plasmáticas. Por fim, estes primeiros dados farmacocinéticos de *S*-(+)-linalol em uma espécie de peixe corroboram a hipótese que este fitoquímico possui grande potencial para futura aplicação em aquicultura como sedativo e anestésico. Ainda assim, por se tratar de resultados inéditos, outras inúmeras dúvidas surgem e com elas a necessidade de continuidade de estudos a fim de garantir a eficácia e segurança noutras espécies bem como a segurança dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2009.

ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121347>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS). Aquacen benzocaína 200 mg/ml, concentrado para solución para baño. Departamento de Medicamentos Veterinarios. 2016. Disponível em: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/p/3394+ESP/P_3394+ESP.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2020.

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS). Tricaine Pharmaq 1000 mg/g polvo para solución para el tratamiento de peces. Departamento de Medicamentos Veterinarios. 2013. Disponível em: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/2747+ESP/FT_2747+ESP.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2020.

ALMEIDA, A. P. G. et al. Essential oils and eugenol as anesthetics for *Serrasalmus rhombeus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, n. 1, p. 44–50, 2018. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/06_ESSENTIAL-OILS-AND-EUGENOL-AS-ANESTHETICS-FOR-SERRASALMUS-RHOMBEUS.html>. Acesso em: 16 set. 2019.

ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, v. 17, n. 2, p. 301–307, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(1997\)017<0301:TUOCOA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1997)017<0301:TUOCOA>2.3.CO;2)>. Acesso em: 18 ago. 2020.

ANVISA. Instrução normativa N° 51, de 19 de dezembro de 2019. Diário oficial da união, 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>>. Acesso em: 13 ago. 2020.

ANVISA. Limites Máximos de Resíduo de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5>. Acesso em: 17 jul. 2020.

APROTOSOAIÉ, A. C. et al. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 29, n. 4, p. 193–219, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ffj.3197>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

APVMA. Australian Pesticide and Veterinary Medicines Authority. AQUI-S aquatic anesthetic, 1997. Disponível em: <https://portal.apvma.gov.au/pubcris;jsessionid=Xtueqteo0S0PHLkLHx1dXx5p?p_auth=9MakiERF&p_p_id=pubcrisportlet_WAR_pubcrisportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=2&p_p_col_count=4&_pubcrisportlet_WAR_pubcrispo>. Acesso em: 10 ago. 2020.

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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BALDISSERA, M. D. et al. Diphenyl diselenide dietary supplementation protects against fumonisin B1-induced oxidative stress in brains of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, v. 231, p. 108738, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108738>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

BALDISSERA, M. D. et al. Disturbance of energetic homeostasis and oxidative damage provoked by trichlorfon as relevant toxicological mechanisms using silver catfish as experimental model. *Chemico-Biological Interactions*, v. 299, p. 94–100, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.015>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

BALDISSERA, M. D. et al. Involvement of xanthine oxidase inhibition with the antioxidant property of nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil in fish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Fish Diseases*, v. 41, n. 5, p. 791–796, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jfd.12779>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

BALDISSERA, M. D. et al. Modulation of acetylcholinesterase activity exerts anti-inflammatory effect in spleen and immune cells of fish fed with a diet contaminated by aflatoxin B1. *Aquaculture*, v. 502, p. 8–11, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.023>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

BALDISSEROTTO, B. et al. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. *Neotropical Ichthyology*, v. 16, n. 1, p. e170128, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170128>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BALDISSEROTTO, B. et al. *Farmacologia Aplicada à Aquicultura*. 1o ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2017. 656 p.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. *Criação de Jundiá*. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

- BANDEIRA JUNIOR, G. et al. *Citrobacter freundii* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*): Hematological and histological alterations. *Microbial Pathogenesis*, v. 125, p. 276–280, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.038>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- BANDEIRA JUNIOR, G. et al. *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* essential oils are anxiolytic without inducing aversiveness in fish. *Aquaculture*, v. 482, p. 49–56, 2018 a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848617307676?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 dez. 2018.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research*, v. 32, n. 2, p. 121–123, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2109.2001.00539.x>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture*, v. 253, n. 1–4, p. 317–321, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848605003741>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversity: Potential source for drug discovery. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- BATISTA, E. dos S. et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture*, v. 495, p. 545–549, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.040>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- BAUMGARTNER, G. et al. Siluriformes. In: Peixes do baixo rio Iguaçú. Maringá: Eduem, 2012. 203 p. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sn23w/pdf/baumgartner-9788576285861.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2018.
- BELSITO, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 11, p. S1–S71, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691508003657?via%3Dihub#bib127>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- BENOVIT, S. C. et al. Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 43, n. 6, p. 896–900, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-7345.2012.00604.x>>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- BENOVIT, S. C. et al. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 3, p. 1675–1689, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140223>>. Acesso em: 25 nov. 2018.
- BIANCHINI, A. E. et al. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and *S*-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and

GABAergic activity. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 50, n. 12, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20176346>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

BIANCHINI, A. E. Mecanismo de ação de monoterpenoides com atividade sedativa e anestésica em jundiás (*Rhamdia quelen*). 2017b, 50 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

BOAVENTURA, T. P. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753) as anesthetic for *Lophiosilurus alexandri*: Induction, recovery, hematology, biochemistry and oxidative stress. Aquaculture, v. 529, p. 735676, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735676>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

BOHNERT, T.; GAN, L. Plasma protein binding : From discovery to development. Journal de Pharmaceutical Sciences v. 102, n. 9 p. 2953–2994. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jps.23614>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

BOIJINK, C. de L. et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture, v. 457, p. 24–28, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.010>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12o ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2012, 2101 p.

CAL, K.; SZNITOWSKA, M. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes - In vitro studies. Journal of Controlled Release, v. 93, n. 3, p. 369–376, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.002>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

CHADHA, A.; MADYASTHA, K. M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. Xenobiotica, v. 14, n. 5, p. 365–374, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/00498258409151425>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

CHANOTIYA, C. S.; YADAV, A. Enantiomeric composition of (3R)-(-)- and (3S)-(+)-linalool in various essential oils of Indian origin by enantioselective capillary gas chromatography-flame ionization and mass spectrometry detection methods. Natural Product Communications, v. 4, n. 4, p. 563–6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476006>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

CHANTRAINE, J. M.; DHÉNIN, J. M.; MORETTI, C. Chemical variability of rosewood (*Aniba rosaeodora*) essential oil in french guiana. Journal of Essential Oil Research, v. 21, n. 6, p. 486–495, 2009. Disponível em: <<http://www.documentation.ird.fr/hor/PAR00004276>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

CHEN, M. et al. Uptake and depuration of eight fluoroquinolones (FQs) in common carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 180, p. 202–207, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.075>>. Acesso em: 17 jan. 2020.

- CHENG, B.; SHEEN, L.; CHANG, S. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, v. 5, n. 1, p. 27–34, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.10.007>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- CONSOER, D. M. et al. Toxicokinetics of perfluorooctane sulfonate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 3, p. 717–727, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3230>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- CUNHA, J. A. et al. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: Efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotropical Ichthyology*, v. 15, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20160076>>. Acesso em: 4 jan. 2019
- CUNHA, J. A. et al. The antibacterial and physiological effects of pure and nanoencapsulated *Origanum majorana* essential oil on fish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, v. 124, p. 116–121, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.040>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- CUNHA, J. A. et al. The survival and hepatic and muscle glucose and lactate levels of *Rhamdia quelen* inoculated with *Aeromonas hydrophila* and treated with terpinen-4-ol, carvacrol or thymol. *Microbial Pathogenesis*, v. 127, p. 220–224, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.005>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish , *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, v. 306, n. 1–4, p. 403–406, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>>. Acesso em: 09 dez. 2018.
- DA SILVA, L. A. et al. Essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* as anesthetics for the South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture*, v. 528, p. 735595, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735595>>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The Pharmaceutical Industry in 2018. An Analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules*, v. 24, n. 4, p. 809, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/24/4/809>>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, v. 6, n. 2, p. 107–113, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374249>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- ERICKSON, R. J. et al. Uptake and elimination of ionizable organic chemicals at fish gills: II. observed and predicted effects of ph, alkalinity, and chemical properties. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 6, p. 1522-1532, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1897/05-359R.1>>. Acesso em: 7 jan. 2019.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for medicinal products for veterinary use european public MRL assessment report (EPMAR) isoeugenol (fin fish), 2011. Disponível em: <www.ema.europa.eu>. Acesso em: 21 maio. 2020.

EVALUATIONS OF THE JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). Linalool, 1998. Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4144>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

FAN, J.; LANNOY, D. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, v. 87, p. 93–120, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

FANG, W. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of thiamphenicol and florfenicol in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in freshwater following oral administration. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 25, n. 2, p. 83–89, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08997659.2012.754799>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

FENG, J.B.; JIA, X. P. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) held in freshwater at 22 °C. *Aquaculture*, v. 289, n. 1–2, p. 129–133, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.023>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, p. 224, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/ca9229en>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OF THE UNITED NATIONS (FDA). Drugs indexing | FDA, 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/minor-use/minor-species/drug-indexing>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OF THE UNITED NATIONS (FDA). Guidance for industry concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish, 2007. Disponível em: <<http://www.regulations.gov>>. Acesso em: 7 ago. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OF THE UNITED NATIONS (FDA). The index of legally marketed unapproved new animal drugs for minor species | FDA. 2009. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/minor-use/minor-species/index-legally-marketed-unapproved-new-animal-drugs-minor-species>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OF THE UNITED NATIONS (FDA). Approved aquaculture drugs, 1997. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/1782>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

FREW, J. A. et al. Toxicokinetics of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, v. 205, p. 34–42, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378254>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

FRIEDL, S. M. et al. Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC/MS analysis for the quantification of (-)-linalool in human whole blood samples. *Natural product communications*, v. 5, n. 9, p. 1447–52, 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20923006>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

FRIEDMAN, M. H. Principles and models of biological transport. 2a ed. Durham: Springer, 2008, 520 p.

FU, G. et al. Effects of inducers of cytochrome P450s on enrofloxacin N-deethylation in crucian carp *Carassius auratus gibelio*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 46, p. 188–193, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.07.015>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

GARLET, Q. I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABA_A receptors and stress response in fish model. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 49, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154872>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

GARLET, Q. I. et al. GABA_A receptor subunits expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) brain and its modulation by *Nectandra grandiflora* Nees essential oil and isolated compounds. Behavioural Brain Research, v. 376, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112178>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

GAUNT, P. S. et al. Multidose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 36, n. 5, p. 502–506, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2012.01426.x>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

GOMES, D. P.; CHAVES, B. W.; BECKER, A. G. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture Research, v. 42, n. 6, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02864.x>>. Acesso em: 08 ago. 2018

GOMUŁKA, P. et al. Pharmacokinetics of propofol in rainbow trout following bath exposure. Polish Journal of Veterinary Sciences, v. 18, n. 1, p. 147–152, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25928922>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

GRESSLER, L. T. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. Aquaculture Research, v. 45, n. 6, p. 1061–1072, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.12043>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

GRIFFITHS, F. P.; WEBB, G.; SCHNEIDER, P. W. Ether Anesthesia of steelhead trout. Transactions of the American Fisheries Society, v. 70, n. 1, p. 272–274, 1941. Disponível em: <[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1940\)70\[272:EAOST\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1940)70[272:EAOST]2.0.CO;2)>. Acesso em: 4 jan. 2019.

GUÉNETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v. 266, n. 1–4, p. 262–265, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

HANSEN, M. K.; NYMOEN, U.; HORSBERG, T. E. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of metomidate in turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 26, n. 2, p. 95–103, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00454.x>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

HASSELBERG, L. et al. Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology*, v. 4, n. 1, p. 2, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1476-5926-4-2>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

HEALTH CANADA. Product information: Aquacalm. Drug Product Database Online Query. 1991. Disponível em: <<https://health-products.canada.ca/dpd-bdpp/info.do?lang=en&code=13831>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

HEALTH CANADA. Product information: Aqua Life TMS-PWR. Drug Product Database Online Query. 1997. Disponível em: <<https://health-products.canada.ca/dpd-bdpp/info.do?lang=en&code=44117>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

HEGELUND, T. et al. Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 5, p. 1326, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1897/03-155>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

HELDWEIN, C. G. et al. 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/vaa.12146>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

HELDWEIN, C. G. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 5, p. 436–443, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500052>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

HOSEINI, S. M.; MIRGHAED, A. T.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/raq.12245>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

HUANG, S. et al. Rapid detection of five anesthetics in tilapias by in vivo solid phase microextraction coupling with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 168, p. 263–268, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.045>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

HUANG, Y. et al. Pharmacokinetics of florfenicol in blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*) at two water temperatures with single-dose oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 42, n. 5, p. 564–571, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvp.12773>>. Acesso em: 14 maio. 2020.

ITÁLIA. Decree n. 33 of 22 March 2013. Marketing authorization for the veterinary medicinal product "Tricaine Pharmaq 1000 mg/ml, powder for solution for the treatment of fish, 2013. Disponível em: <https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.data PubblicazioneGazzetta=2013-04-15&atto.codiceRedazionale=13A03123&elenco30giorni=false>. Acesso em: 6 ago. 2020.

JAGER, W. et al. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *Journal Society Cosmetic Chemical*, v. 43, p. 49-54, 1992. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/3530/6465958d8e35e36e7933fa57ba134fe4f9b3.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, v. 21, n. 5, p. 382–396, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/med.1015>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, n. 6, p. 1545–1552, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10695-012-9682-5>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

KATSUYAMA, S. K. et al. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, v. 36, n. 1, p. 47–54, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.2220/biomedres.36.47>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

KE, C. et al. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets. *Aquaculture*, v. 484, n. 231, p. 338–342, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.034>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

KENNEDY, C. J.; TIERNEY, K. B.; MITTELSTADT, M. Inhibition of P-glycoprotein in the blood–brain barrier alters avermectin neurotoxicity and swimming performance in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, v. 146, p. 176–185, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X13003056?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

KIESSLING, A. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.037>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, v. 232, n. 1–4, p. 265–277, 2004. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00483-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00483-6)>. Acesso em: 14 jan. 2019.

KOOMHIN, P. et al. Michelia essential oil inhalation increases fast alpha wave activity. *Scientia Pharmaceutica*, v. 88, n. 2, p. 23, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-0532/88/2/23>>. Acesso em: 7 set. 2020.

KRISTAN, J. et al. Efficacy of different anaesthetics for pikeperch (*Sander lucioperca* L.) in relation to water temperature. *Neuroendocrinology Letters*, v. 35, n. 2, p. 81-85, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25638370>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews*, v. 21, n. 5, p. 397–411, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1157944>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

LE, Q. et al. Transcriptomic and cortisol analysis reveals differences in stress alleviation by different methods of anesthesia in Crucian carp (*Carassius auratus*). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 84, p. 1170–1179, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.061>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

LIANG, J. et al. 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, n. 4, p. 644–653, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00343-012-1228-2>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

LIM, J. H. et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. *Aquaculture*, v. 307, n. 1–2, p. 71–74, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.003>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

LINCK, V. de M. et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, v. 16, n. 4, p. 303–307, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.001>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

LIU, J. et al. Science of the total environment tissue distribution, bioconcentration, metabolism, and effects of erythromycin in crucian carp (*Carassius auratus*). *Science of the Total Environment*, v. 490, p. 914–920, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.055>>. Acesso em: 18 out. 2018.

LOPES, J. M. et al. Citrus x aurantium essential oil as feed additive improved growth performance, survival, metabolic, and oxidative parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 2018. b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/anu.12854>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

LOPES, J. M. et al. Essential oils from Citrus x aurantium and Citrus x latifolia (Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, v. 16, n. 2, 2018. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170152>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology*, v. 76, p. 22–76, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.006>>. Acesso em: 24 maio. 2020.

LUCKENBACH, T.; FISCHER, S.; STURM, A. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 165, p. 28–52, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.05.002>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

MANSOUR, A. et al. Disposition of ¹⁴C-flumequine in sea bream (*Sparus auratus*) after single intraperitoneal administration. *Food Control*, v. 72, p. 198–204, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.023>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

MAZANDARANI, M.; HOSEINI, S. M. Menthol and 1,8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, v. 48, n. 6, p. 3041–

3051, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.13136>>. Acesso em: 2 set. 2020.

MCFARLAND, W. A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes. Publications of the Institute of Marine Sciences, v. 6, p. 22–55, 1959. Disponível em: <https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Add_PDFs/Fish_Anesthetics.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2019.

MEESTERS, R. J. W.; DUISKEN, M.; HOLLENDER, J. Study on the cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of the terpene alcohol linalool: Indication of biological epoxidation. *Xenobiotica*, v. 37, n. 6, p. 604–617, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614007>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

MEINERTZ, J. R. et al. Depletion of eugenol residues from the skin-on fillet tissue of rainbow trout exposed to ¹⁴C-labeled eugenol. *Aquaculture*, v. 430, p. 74–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.050>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

MEINERTZ, J. R. et al. Determination of the exposure parameters that maximise the concentrations of the anaesthetic/sedative eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 31, n. 9, p. 1522–1528, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2014.939720>>. Acesso em: 23 jun. 2020.

MEINERTZ, J. R. et al. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-STM at different temperatures, durations, and concentrations. *Aquaculture*, v. 254, n. 1–4, p. 347–354, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.028>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H.; ALLEN, J. L. Metabolism and elimination of benzocaine by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Xenobiotica*, v. 21, n. 4, p. 525–533, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/00498259109039492>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-S? exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 296, n. 3–4, p. 200–206, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.08.022>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Carta de Alerta ao médico veterinário – Uso responsável de produtos veterinários, n. 61, p. 1–2, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/produtos/documentos-orientativos/carta-de-alerta-ao-medico-veterinario-2013-uso-responsavel-de-produtos-veterinarios/view>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 26, de 9 de julho de 2009, 2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>>. Acesso em: 10 jul. 2020

MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES OF JAPAN (MAFF). The 28th Report on Usage of Fisheries Drug, 2016. Disponível em: <http://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/index.html>. Acesso em: 12 ago. 2020.

MIRGHAED, A. T.; GHELICHPOUR, M.; HOSEINI, S. M. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. *Aquaculture*, v. 464, p. 165–170, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848616303325>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). Mass spectral library (NIST/EPA/NIH), Gaithersburg, USA (2008).

NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *ILAR Journal*, v. 50, n. 4, p. 343–360, 2009. Disponível em: <<https://vpresearch.louisiana.edu/sites/research/files/NeifferFishSedation.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

NEW ZEALAND FOOD SAFETY (NZFS). Ministry for Primary Industries - ACVM Register. 1994. Disponível em: <https://eatsafe.nzfsa.govt.nz/web/public/acvm-register?p_p_id=searchAcvm_WAR_aaol&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&_searchAcvm_WAR_aaol_action=search>. Acesso em: 10 ago. 2020.

NORWEGIAN MEDICINES AGENCY (NOMA). Medicines approved. Benzocaine. 2001. Disponível em: <<https://www.legemiddelsok.no/sider/default.aspx?searchquery=benzocaine&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

NORWEGIAN MEDICINES AGENCY (NOMA). Medicines approved. Tricaine Pharmaq-1000 mg/g. 2013a. Disponível em: <<https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=40da1837-a5a0-4885-8319-ad9ba61c99ab&searchquery=tricaine&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

NORWEGIAN MEDICINES AGENCY (NOMA). Medicines approved. AQUI-S. 2013b. Disponível em: <<https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=95f43a64-33ae-4224-a7ae-0114c9f4aefd&searchquery=isoeugenol&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

O'BROWN, N. M.; PFAU, S. J.; GU, C. Bridging barriers: A comparative look at the blood-brain barrier across organisms. *Genes and Development*, v. 32, n. 7–8, p. 466–478, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5959231/>>. Acesso em 04: jan. 2019.

ODA, A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects in koi carp (*Cyprinus carpio*) following immersion in propofol. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, v. 45, n. 4, p. 529–538, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29705687>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

OECD. SIDS Initial Assessment Report for SIAM 14, Linalool, CAS No. 78-70-6. Paris. 2002 Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/78706.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

OLIVEIRA, A. E. De; COSTA, T. D. Interações farmacocinéticas entre as plantas medicinais *Hypericum perforatum*, *Gingko biloba* e *Panax ginseng* e fármacos tradicionais. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 23, n. 4, p. 567–578, 2004. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/4/LAJOP_23_4_8_2_B18FM4777E.pdf>. Acesso em: 2 set. 2020.

OTA, M. et al. (–)-Linalool influence on the cerebral blood flow in healthy male volunteers revealed by three-dimensional pseudo-continuous arterial spin labeling. *Indian Journal of Psychiatry*, v. 59, n. 2, p. 225, 2017. Disponível em: <<http://www.indianjpsychiatry.org/text.asp?2017/59/2/225/210738>>. Acesso em: 7 set. 2020.

ÖZEK, T. et al. Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Records of Natural Products*, v. 4, n. 4, p. 180-192, 2010. Disponível em: <www.acgpubs.org/RNP>. Acesso em: 18 jan. 2019.

PARKE, D. V.; RAHMAN, K. H. M. Q. Q.; WALKER, R. The absorption, distribution and excretion of linalool in the rat. *Biochemical Society Transactions*, v. 2, n. 4, p. 612–615, 1974. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0020612>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

PRIBORSKY, J.; VELISEK, J. A review of three commonly used fish anesthetics. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, v. 26, n. 4, p. 417–442, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1442812>>. Acesso em: 05 jan. 2019.

RAIRAT, T. et al. Temperature-dependent pharmacokinetics of florfenicol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following single oral and intravenous administration. *Aquaculture*, v. 503, p. 483–488, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.081>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia, Rang e Dale*. 8a ed. Elsevier, 2016, 1934 p.

READMAN, G. D. et al. Do fish perceive anaesthetics as aversive? *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e73773, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073773>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

REN, X.; PAN, L.; WANG, L. Tissue distribution, elimination of florfenicol and its effect on metabolic enzymes and related genes expression in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* following oral administration. *Aquaculture Research*, v. 47, n. 5, p. 1584–1595, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/are.12619>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

RODRIGUES, P. et al. Nociceptive-like behavior and analgesia in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Physiology and Behavior*, v. 210, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112648>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

ROSA, J. et al. Tissue depletion of five antibiotic residues in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, v. 498, p. 413–421, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.035>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

ROSA, S. C. Estimação do período de carência de medicamento veterinário em produtos comestíveis (tecidos) de origem animal por modelos de regressão, 2016, p. 288. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

ROSS, B.; ROSS, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for*. 3a ed. Blackwell Publishing Ltd, 2008, 240 p.

SACCOL, E. M. H. et al. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, v. 416–417, p. 244–254, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848613004948>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

SANTOS, A. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 62, p. 213–216, 2017. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.032>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

SANTOS, A. C. et al. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 44, n. 1, p. 106–113, 2017. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/vaa.12386>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, A. M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Investigations in Fish Control*, v. 13, p. 15, 1967. Disponível em: <<https://pubs.er.usgs.gov/publication/ifc13>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, A. M. Efficacy of quinaldine as an anesthetic for seven species of fish. *Investigations in Fish Control*, v. 22, p. 10, 1969. Disponível em: <<https://pubs.er.usgs.gov/publication/ifc22>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

SHI, F. et al. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 10, p. 2320–2328, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2016.1155630>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

SILVA, E. et al. Assessment of induction and recovery times of anaesthesia in *Astyanax bimaculatus* using 2-phenoxyethanol and the essential oils of *Melaleuca alternifolia* and *Ocimum gratissimum*. *Aquaculture Research*, v. 51, n. 2, p. 577–583, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.14404>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

- SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. *Neotropical Ichthyology*, v. 13, n. 4, p. 715–722, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000400715&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, v. 350–353, p. 91–97, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.012>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- SILVA, L. L. et al. S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 1, p. 203–212, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150643>>. Acesso em: 24 nov. 2018.
- SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017a. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/cfi/6/44!/4/2/2@0:0>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- SIMÕES, L. N. et al. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, v. 50, n. 3, p. 205–217, 2017b. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10236244.2017.1362317>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- SINDICADO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL (SINDAN). *Compêndio de produtos veterinários*. 2020. Disponível em: <<https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/>>. Acesso em: 6 ago. 2020.
- SKÅR, M. W. et al. Development of anaesthetic protocols for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Effect of anaesthetic concentrations, sea water temperature and body weight. *PLOS ONE*, v. 12, n. 7, p. e0179344, 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179344>>. Acesso em: 8 jan. 2019.
- SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, v. 218, n. 1–4, p. 177–185, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848602003022>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- SMITH, M. S. et al. Analysis of short-term cortisol stress response in channel catfish by anesthetization with metomidate hydrochloride and tricaine methanesulfonate. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 27, n. 3, p. 152–155, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/08997659.2015.1047537>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- SNEDDON, L. U. Evolution of nociception and pain: evidence from fish models. *Philosophical Transaction Royal Society*, v. 374, p. 20190290, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2019.0290>>. Acesso em: 03 ago. 2020.

- SOUSA, D. P. et al. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Natural product communications*, v. 5, n. 12, p. 1847–51, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299105>>. Acesso em: 13 jan. 2019.
- SOUZA, C. de F. et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 21–34, 2018a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10695-017-0410-z>>. Acesso em: 24 nov. 2018.
- SOUZA, C. de F. et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 785, 2019. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- SOUZA, C. F. et al. Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish? *Aquaculture*, v. 486, p. 217–223, 2018b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848617320264>>. Acesso em: 25 nov. 2018.
- SOUZA, C. F. et al. *Melaleuca alternifolia* essential oil nanoparticles ameliorate the hepatic antioxidant/oxidant status of silver catfish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, v. 108, p. 61–65, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.016>>. Acesso em: 4 jan. 2019.
- SOUZA, C. F. et al. Serum and hepatic oxidative damage induced by a diet contaminated with fungal mycotoxin in freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*: Involvement on disease pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, v. 124, p. 82–88, 2018c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.041>>. Acesso em: 4 jan. 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. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 21, p. 121–127, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597649>>. Acesso em: 04 jan. 2019.
- STENGER, V.; MAREN, T. The pharmacology of MS-222 (ethyl-m-aminobenzoate) in *Squalus acanthias*. *Comparative and General Pharmacology*, v. 222, p. 23–35, 1974. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(74\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(74)80005-4)>. Acesso em: 28 mar. 2020.
- STORPIRTIS, S. et al. *Farmacocinética Básica e Aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 241 p.
- SUN, Y. X. et al. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. *Aquaculture*, v. 309, n. 1–4, p. 82–85, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.042>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 3, p. 716–726, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/raq.12197>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

TAGO, A. et al. Pharmacokinetics of Eugenol in Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 49, n. 4, p. 780-787, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jwas.12438>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

TEIXEIRA, R. R. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Research*, v. 48, n. 7, p. 3383–3392, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.13165>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: Effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 40, n. 3, p. 701–714, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10695-013-9877-4>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

TOUTAIN, P. L. Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration in drug development and dosage-regimen optimization for veterinary medicine. *AAPS PharmSciTech*, v. 4, n. 4, p. 160–188, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1208/ps040438>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, n. 6, p. 455–466, 2004a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2885.2004.00604.x>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, n. 6, p. 415–425, 2004c. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2885.2004.00605.x>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma terminal half-life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, n. 6, p. 427–439, 2004d. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, n. 6, p. 441–453, 2004b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2885.2004.00602.x>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. *Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica*. 1a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 336 p. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536320236/cfi/35!/4/4@0.00:2.83>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) 2019/6 do parlamento europeu e do conselho de 11 de dezembro de 2018 relativo aos medicamentos veterinários e que revoga a diretiva 2001/82/CE, 2019. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>>. Acesso em: 8 jun. 2020.

VEECK, A. P. et al. Chemical, microbiological, and sensory parameters during the refrigerated storage of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed in vivo to the essential oil of

Lippia alba. Journal of Food Science and Technology, v. 55, n. 4, p. 1416–1425, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-018-3056-7>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

VENTURA, A. S. et al. Pharmacokinetic and physiological responses of *Piaractus mesopotamicus* anesthetized with the essential oil of *Lippia alba*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, v. 14, n. 1, p. 51–60, 2019a. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/334129337>>. Acesso em: 18 maio. 2020.

VENTURA, A. S. et al. Physiological and pharmacokinetic responses in neotropical *Piaractus mesopotamicus* to the essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) as an anesthetic. International Aquatic Research, p. 1-12, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40071-019-0215-z>>. Acesso em 24 jan. 2019.

VETERINARY MEDICINES DIRECTORATE (VMD). Product Information Database, Reino Unido, 2013. Disponível em: <<https://www.vmd.defra.gov.uk/ProductInformationDatabase/Default.aspx>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

VORBACH, B. S. et al. Pharmacokinetics of Oxytetracycline in the Giant Danio (*Devario aequipinnatus*) following bath immersion. Aquaculture, v. 498, p. 12–16, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848618309323>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

WEBER, E. et al. Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. Compendium, v. 31, n. 2, p. E11, 2009. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/24202852>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

WEBER, R. A. et al. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture, v. 321, n. 1–2, p. 108–112, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.029>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

WINLOW, W.; DI COSMO, A. Editorial: Sentience, Pain, and Anesthesia in Advanced Invertebrates. Frontiers in Physiology, v. 10, p. 1141, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01141/full>>. Acesso em: 25 mar. 2020.

XU, L. et al. 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. 126, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717066/>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

XU, N. et al. A physiologically based pharmacokinetic model of doxycycline for predicting tissue residues and withdrawal intervals in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food and Chemical Toxicology, v. 137, p. 111127, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111127>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

YANG, F. et al. Depletion study and withdrawal period calculation of florfenicol in the crucian carp (*Carassius auratus*) following multiple intramuscular injections. Journal of

Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 43, n. 1, p. 79–86, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvp.12822>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

YOUSEFI, M. et al. Anesthetic efficacy and biochemical effects of citronellal and linalool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) juveniles. Aquaculture, v. 493, p. 107–112, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.054>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

YOUSEFI, M. et al. Change in blood stress and antioxidant markers and hydromineral balance of common carp (*Cyprinus carpio*) anaesthetized with citronellal and linalool: Comparison with eugenol. Aquaculture Research, v. 50, n. 4, p. 1313–1320, 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.14007>>. Acesso em: 18 fev. 2020.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) — Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. Aquaculture, v. 295, n. 1–2, p. 52–59, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.019>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: Implications for welfare. Fish Physiology and Biochemistry, v. 38, n. 1, p. 201–218, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10695-011-9565-1>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

ZEIADEH, I. et al. Strategies for enhancing the permeation of CNS-active drugs through the blood-brain barrier: A review. Molecules, v. 23, n. 6, p. 1289, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/23/6/1289>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

ZEIDAN, G. C.; BARROSO, C. M.; BOEHS, G. Efficiency of anesthetics on female gastropod *Littoraria angulifera*. Boletim do Instituto de Pesca, v. 44, n. 3, p. e304, 2018. Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br/13_EFFICIENCY-OF-ANESTHETICS-ON-FEMALE-GASTROPOD_LITTORARIA-ANGULIFERA.html>. Acesso em: 26 mar. 2020.

ZEPPENFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* - Stress and antioxidant parameters. Aquaculture Nutrition, v. 23, n. 6, p. 1362–1367, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/anu.12511>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

ZHAO, D. H. et al. Elimination kinetics of eugenol in grass carp in a simulated transportation setting. BMC Veterinary Research, v. 13, n. 1, p. 4–9, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1273-3>>. Acesso em: 19 nov. 2018.