

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

ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*) EM CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): PARÂMETROS OXIDATIVOS E
OSMORREGULATÓRIOS

Milena Fortuna

Santa Maria, RS

2019

Milena Fortuna

**ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*) EM CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): PARÂMETROS OXIDATIVOS E
OSMORREGULATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título em **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Alves da Cunha

Santa Maria, RS
2019

Fortuna, Milena

ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (Zingiber officinale) EM
CARPA CAPIM (Ctenopharyngodon idella): PARÂMETROS
OXIDATIVOS E OSMORREGULATÓRIOS / Milena Fortuna.- 2019.
71 p.; 30 cm

Orientador: Mauro Alves da Cunha
Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Óleo Essencial 2. Carpa Capim 3. Estresse
Oxidativo 4. Osmorregulação 5. Gengibre I. Alves da
Cunha, Mauro II. Mânica da Cruz, Ivana Beatrice III.
Título.

Milena Fortuna

**ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*) EM CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): PARÂMETROS OXIDATIVOS E
OSMORREGULATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título em **Mestre em Farmacologia**

Aprovado em 19 de fevereiro de 2019

Mauro Alves da Cunha Dr. (UFSM)

Bernardo Baldisserotto PhD. (UFSM)

Levy de Carvalho Gomes PhD. (V da Universidade Vila Velha)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Mauro Alves da Cunha pela acolhida, disposição, comprometimento e acima de tudo pela confiança e parceria. És um grande profissional que admiro muito.

Á todos do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE) pelo auxílio em todas as atividades, que foram desenvolvidas com muito empenho, essenciais para a realização desse trabalho, em especial a Marisa Brasil pela paciência, amparo e todos os ensinamentos ao longo deste percurso.

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo apoio incondicional em todos os momentos, particularmente a minha mãe Gilse, meu pai Moacir, minha irmã Gabrieli, e meu namorado Jacson, que sempre me incentivaram e acompanharam todos os meus passos no decorrer dessa trajetória, tornando-a em parte sua também. Amo vocês!

A Carine Souza pelo incentivo, dedicação, envolvimento e esforço, que me ajudou imensamente, tens minha gratidão.

Ao laboratório de Bioquímica pelas colaborações.

Ao laboratório de Biogenômica e especialmente a professora Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pelas primeiras oportunidades e aprendizados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, e a UFSM, universidade pública de qualidade, pela oportunidade de desenvolver esse estudo.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram tanto para minha formação acadêmica como para construção na busca por ser uma pessoa melhor.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

RESUMO

EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Zingiber officinale* EM CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*)

AUTORA: Milena Fortuna

ORIENTADOR: Mauro Alves da Cunha

O gengibre (*Zingiber officinale*) tem vários efeitos benéficos já investigados, em espécies como ratos Wistar e peixes (*Cyprinus carpio*). No organismo, o efeito prejudicial dos radicais livres (ROS) ocorre quando eles estão em quantidades excessivas no corpo e os antioxidantes combatem esse efeito. A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) é uma das mais importantes e mais consumidas espécies de peixes de água doce do mundo. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do óleo essencial de gengibre (EOG) como antioxidante, considerando a fisiologia da carpa capim. Para isso, os parâmetros avaliados foram bioquímicos, sanguíneos, de fluxo iônico e acetilcolinesterase (AChE). Os dados são relatados como média \pm desvio padrão. Nenhuma mortalidade foi registrada durante os experimentos. Os níveis plasmáticos de glicose e proteína total não diferiram significativamente entre os grupos, assim como acetilcolinesterase no cérebro e músculo. Nos três tempos de amostragem e duas concentrações testadas pelo EOG, a atividade da SOD foi significativamente maior no fígado ($17,36 \pm 3,14$, $17,19 \pm 3,67$) e no rim ($15,97 \pm 2,42$, $16,48 \pm 2,95$), quando comparada ao grupo controle ($14,63 \pm 0,92$, $14,09 \pm 0,65$), exceto para a atividade da SOD no fígado após 1 hora ($11,41 \pm 3,42$, $11,55 \pm 1,58$). Os níveis de GPx começaram a aumentar no fígado a $50 \mu\text{L L}^{-1}$, de 4 horas de tratamento ($23,38 \pm 0,65$) para 8 horas ($24,63 \pm 4,82$) na concentração de $100 \mu\text{L L}^{-1}$, após 8 horas de exposição no rim ($39,74 \pm 7,62$). A concentração de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ induziu uma sedação leve. O fluxo iônico de potássio (K^+) teve um influxo na concentração de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ como o íon cloro (Cl^-) a $50 \mu\text{L L}^{-1}$. O EOG induz a atividade antioxidante das enzimas em ambas as concentrações, melhorando os níveis oxidativos, e tem um efeito leve de sedação após 8 horas de exposição.

Palavras-chave: Peixe, Gengibre, Estresse oxidativo, Produto Natural

ABSTRACT**ANTIOXIDANT EFFECTS OF *Zingiber officinale* ESSENTIAL OIL IN GRASS CARP (*Ctenopharyngodon idella*)**

AUTHOR: Milena Fortuna

ADVISOR: Mauro Alves da Cunha

Ginger (*Zingiber officinale*) has several beneficial effects already investigated, in species like Wistar rats and fish (*Cyprinus carpio*). In the organism, the harmful effect of free radicals (ROS) occurs when they are in excessive amounts and the antioxidants combat this effect. The Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), is the one of the most important and most highly consumed freshwater fish species in the world. The aim of the present study was to investigate the effects of ginger essential oil (EOG) as an antioxidant, considering the physiology of grass carp. For this, the parameters evaluated were biochemical, blood, ion flow and acetylcholinesterase (AChE). Data are reported as mean \pm SE. No mortality was registered for the duration of the experiments. Plasma glucose and protein levels did not differ significantly among the groups, as acetylcholinesterase in brain and muscle. On the three sampling times and two concentrations EOG tested, SOD activity was significantly higher in the liver (17.36 ± 3.14 , 17.19 ± 3.67) and in the kidney (15.97 ± 2.42 , 16.48 ± 2.95), when compared to the control group (14.63 ± 0.92 , 14.09 ± 0.65), except for SOD activity in the liver after 1 hour (11.41 ± 3.42 , 11.55 ± 1.58). GPx levels began to increase in the liver at 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ from 4 hours of treatment (23.38 ± 0.65) to 8 hours (24.63 ± 4.82) at the concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, after 8 hours of exposure in the kidney (39.74 ± 7.62). The concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ induced the stage of light sedation, after 1 hour which lasted up to 8 hours. The ion flux of potassium (K^+) had an influx on the concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ as the ion chloride (Cl^-) at 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. The EOG induces the enzyme antioxidant activity at both concentrations, improving oxidative levels, and has a light sedation after 8 hours of exposition.

Key words: Fish, Ginger, Oxidative stress, Natural Product

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estágios de anestesia. Adaptado de Ross & Ross (2008).....18

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Óleo essencial de gengibre (Foto por Milena Fortuna).....16

Figura 2: Exemplar de carpa capim (Foto por Marisa Teresinha de Bastos Brasil).....17

MANUSCRITO

Figure Captions.....62

Figure 1. TBARS levels in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 2. Protein carbonyl levels in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 3. SOD activity in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 4. GPx activity in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 5. Net Na⁺, Cl⁻, K⁺ fluxes in carp at different concentration of ginger essential oil.

Table 1. High resolution gas chromatography with the components (%) of ginger essential oil. Peaks less than 0.1% were excluded.

Table 2. Effects of ginger essential oil on plasma parameters, glucose (A) and total protein (B) expressed by mg/dL. Data represent the mean \pm SEM.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Óleo essencial	13
1.2 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	14
1.3 Carpa Capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>).....	16
1.4 Anestesia e sedação	17
1.5 Radicais livres e atividade antioxidante.....	20
1.5.1 Atividade antioxidante do gengibre	21
1.6 Acetilcolina e Acetilcolinesterase.....	22
1.7 Regulação iônica em peixes de água doce.....	23
1.7.1 Íon sódio (Na ⁺).....	25
1.7.2 Íon cloro (Cl ⁻).....	26
1.7.3 Íon potássio (K ⁺)	26
1.9 Referências.....	27
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 DESENVOLVIMENTO	38
Manuscrito Antioxidant effects of <i>Zingiber officinale</i> essential oil on grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	40
4 CONCLUSÕES FINAIS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óleo essencial

As plantas medicinais por muito tempo têm formado a base da medicina que já existe há milhares de anos e continuam a oferecer benefícios à humanidade com novos medicamentos (Marques et al, 2016). Atualmente existe um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos dessas plantas que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Filho & Yunes, 1997).

As propriedades farmacêuticas de plantas medicinais são principalmente atribuídas aos óleos essenciais. O termo "óleo essencial" (OE) foi usado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus von Hohenheim (Guenther, 1950). Os OEs de plantas são líquidos oleosos aromáticos e voláteis que contém uma mistura de compostos resultantes do metabolismo secundário da planta, formado em células especiais encontradas nas folhas e caules e comumente concentrados em uma região particular, como folhas, cascas ou frutos (Burt, 2004).

Na natureza, os OEs desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali et. al, 2008). Além disso, os OEs tem sido utilizados como fontes de medicamentos e conservantes de alimentos por mais de 4000 anos e são cada vez mais estudados como antioxidantes e para o controle de micro-organismos (Burt, 2004; Andrade et al, 2012).

Devido às suas fortes características aromáticas e bioatividade, os OEs têm sido amplamente utilizados na aromaterapia, como enriquecedor de sabor em alimentos e fragrâncias em cosméticos, e mais recentemente como produtos farmacêuticos, conservantes naturais, aditivos e biopesticidas (Stevanovi ć et.al, 2018).

O aumento do interesse na utilização das plantas medicinais e seus OE, provindas das administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente (Silveira et al, 2008), pois os mesmos têm uma ampla gama de uso, devido as suas atividades biológicas, que se devem as suas substâncias bioativas, que podem ser benéficas ou nocivas, dependendo da dose empregada (Amorozo, 2002) por

essa razão, a ação dessas substâncias oriundas das plantas, bem como suas doses terapêuticas devem ser devidamente elucidadas.

A composição de cada OE pode variar dependendo de certas condições, tais como variedade vegetal, parte da planta, área de crescimento, mudanças climáticas, tempo de colheita, condições de armazenamento, e o quimiotipo de cada componente (Pauli & Schilche, 2009). A composição química é composta principalmente por hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados, juntamente com aldeídos alifáticos, álcoois e ésteres (Baser & Buchbauer, 2010), que demonstram atividades biológicas em animais e plantas (Elshafie & Camele, 2017).

1.2 Gengibre (*Zingiber officinale*)

Uma alternativa de planta com propriedades bioativas é o gengibre, uma herbácea perene, que cresce até uma altura de cerca de 1 metro. As folhas se desenvolvem a partir do rizoma ramificado e das flores, que lembram as orquídeas. Cada flor tem três pétalas laranja-amareladas com um adicional arroxeada (Mbaveng & Kuete, 2017).

O gengibre é consumido tipicamente como uma pasta fresca, pó seco, fatias conservadas em xarope, doces, para aromatizar chá e na culinária (principalmente chinesa) como especiaria (Ali et al, 2008; Shukla et al, 2007). A pasta serve como material de base para a produção industrial de uma variedade de produtos, e o suco também é usado em algumas aplicações especiais (Shukla et.al, 2019).

Além disso, o gengibre é utilizado na medicina tradicional oriental desde a antiguidade para tratar diversas doenças (Fouda & Berika, 2009), e seus produtos, como o óleo essencial (Figura 1) e óleo resina, são comercializados internacionalmente para uso em processamento de alimentos e usos farmacêuticos (Kamaliroosta et al., 2013).

O rizoma de gengibre contém de 60 a 70% de carboidratos, 3 a 8% de fibra bruta, 8 a 9% de proteína, 3 a 6% de óleo graxo e 2 a 3% de óleo volátil. Foram identificados mais de 115 compostos no gengibre cru, apresentando uma excelente fonte de vários compostos fenólicos bioativos, incluindo compostos pungentes, não voláteis e antioxidantes, como gingerols, shogaols e zingeronas, além de outros compostos como cineol, pineno, β -caroteno, ácido cafeico e curcumina (Srinivasan, 2017).

A pungência do gengibre fresco é devida ao gingerol, que é o constituinte mais abundante entre os gingeróis, enquanto que a pungência do gengibre seco ou cozido se deve aos shogaols. Esses compostos são rapidamente absorvidos em animais e humanos, se acumulando em vários tecidos, sendo extensivamente metabolizados no organismo e excretados como metabólitos (Srinivasan, 2017).

Vários efeitos benéficos provenientes dessa planta já foram comprovados, como no tratamento e prevenção de artrite utilizando o extrato hidroalcolico, (Fouda & Berika, 2009), anti-inflamatório, onde o primeiro estudo a demonstrar esse efeito (Grzanna et.al, 2005 apud. Kiuchi et.al, 1982) atestou que os extratos de plantas pertencentes a família Zingiberaceae inibem a síntese de prostaglandinas (PGs) *in vitro*. Foi utilizado extrato de gengibre fresco, submetido a purificação cromatográfica, e posteriormente, análise das frações resultantes para seu efeito sobre a síntese de PGs. Os compostos foram isolados, e identificaram o [6] -gingerol e outros quatro compostos estruturalmente relacionados, como responsáveis por esse efeito, em homogenatos de medula renal de coelho com valores de IC50 variando de 1,0 a 5,5 µl.

Além disso, o gengibre também possui atividade antimicrobiana, onde seus metabólitos elevaram a atividade de outros compostos antimicrobianos, aumentando assim sua efetividade. Isso se deve ao aumento da desintegração das paredes celulares bacterianas, o que possivelmente poderia interferir com o aumento da resistência dos patógenos, aumentando assim o tempo útil dos antibióticos (Silva et al, 2018).

Um estudo desenvolvido por Majolo e colaboradores (2014) atestou sua eficácia como antimicrobiano, utilizando 14 cepas de salmonela, isoladas de amostras de frango, com o óleo essencial obtido a partir do rizoma da planta, nas concentrações de 20000, 10000, 5000, 2500, 1250 e 625 µg.mL⁻¹. Essa atividade foi reforçada por Zang et al (2013), onde utilizou uma MIC de 0,02 mg/mL para o 6-gingerol contra *Helicobacter pylori*, responsável por câncer gástrico em humanos, quando comparado à amoxicilina como controle positivo e 50% Polyethylene glycol (PEG 400) como controle negativo.



Figura 1: Óleo essencial de gengibre (Foto por Milena Fortuna)

1.3 Carpa Capim (*Ctenopharyngodon idella*)

As carpas em geral estão entre as espécies de peixe de maior potencial de crescimento, adaptabilidade e de mais baixo custo de alimentação (Camargo et.al, 2006). A carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) especificamente, é um peixe nativo chinês de água doce, onde o adulto prefere água morna e fluída, pois é importante para a incubação de ovos, enquanto larvas e juvenis se desenvolvem em habitats remanescentes mais silenciosos, como várzeas (Verigin et al., 1978).

As carpas de capim são tolerantes a uma ampla faixa de temperatura, oxigênio e à salinidade, e por essa resitência a baixa temperatura, são bem adaptadas as temperaturas de inverno no sul do Brasil (Garcia et al, 2008). Porém, nessa época, as carpas capim recuam para profundidades dos leitos dos rios (Shireman & Smith 1983).

Um estudo desenvolvido por Cross e colaboradores (1970), atestou que a carpa capim sobrevive a 50% de água do mar por um curto período de tempo, e a migração de peixes de um sistema fluvial para outro por meio do mar é impossível. Entretanto, migrações entre sistemas fluviais adjacentes separados por água salobra são viáveis.

Além disso, se tornou uma importante espécie comercial com uma produção global em constante crescimento produção anual (Wang et al. 2015 apud Chilton et.al, 1992; Shireman & Smith 1983) sendo bem aceita entre os produtores devido a sua

resistência e facilidade de cultivo, aceitação de alimentos peletizados, rápido crescimento e por ser uma fonte de proteína de alta qualidade (Camargo et al. 2006 apud Tripathi & Datta, 1990).

A carpa capim o peixe de água doce mais utilizado no controle biológico de plantas daninhas (Silva et.al, 2014), porque são consumidores vorazes de material vegetal. Eles podem comer 2 a 3 vezes seu peso cada dia e pode ganhar 2-4 kg em um único ano (Bozkurt et. al, 2017). Se alimentam preferencialmente de macrófitas submersas e enraizadas, seguidas por algas filamentosas e vegetação emergente fibrosa (Swanson & Bergersen, 1988). As plantas aquáticas podem facilmente se superpopular e prejudicar o potencial de pesca de um local. O excesso de plantas daninhas em decomposição pode diminuir a quantidade de oxigênio na água, o que pode ser prejudicial para as espécies aquáticas (Bozkurt et. al, 2017).

O efeito direto da carpa capim no ecossistema da água é causada por sua pastagem em macrófitas aquáticas. Se a vegetação estiver em pouca quantidade, a carpa capim utilizará fontes de alimento animal, como lagostim, detrito e zooplâncton (Conover 2007). Os efeitos indiretos estão associados aos seus excrementos, que são ricos em nutrientes, e dependem da quantidade de biomassa vegetal consumida (Pípalová et. al, 2009).



Figura 2: Exemplar de carpa capim (Foto por Marisa Teresinha de Bastos Brasil).

1.4 Anestesia e sedação

Em termos gerais, a sedação (definida como um efeito calmante) é um estado preliminar de anestesia no qual a sonolência é induzida, com percepção sensorial entorpecida e possivelmente alguma analgesia (insensibilidade à dor), mas na qual não há perda grosseira de percepção sensorial ou de equilíbrio. Uma substância anestésica pode produzir sedação, anestesia cirúrgica ou morte, dependendo de fatores como o nível de concentração do composto e da duração da exposição (Ross & Ross, 2008) (Tabela 1).

Já a anestesia é definida como um estado reversível que resulta em inconsciência e perda total de sensibilidade por meio da depressão do sistema nervoso central, e esse estado pode ser seguido por diferentes níveis de analgesia (ausência de dor) e relaxamento muscular (Martins et al., 2018).

Estágio	Descrição	Sinais fisiológicos e comportamentais
I	Sedação leve	Resposta a estímulos, mas movimento reduzido, ventilação diminuída, alguma analgesia, somente receptivo à estimulação grosseira
II	Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio; boa analgesia, perda total do tônus muscular, perda total do equilíbrio, ventilação quase ausente
III	Anestesia cirúrgica	Perda total de reação a mesma estimulação maciça
IV	Colapso medular	Parada de ventilação, parada cardíaca, eventual morte; overdose

Tabela 1: Estágios de anestesia. Adaptado de Ross & Ross (2008).

A sedação e anestesia por imersão em peixes é análoga por inalantes gasosos em animais terrestres. O peixe ventila a substância em solução, que entra na corrente sanguínea através das brânquias e/ou órgãos respiratórios acessórios ou a pele e, em seguida, passa para o sistema nervoso central. Tanto o tecido branquial como a pele contêm grandes quantidades de lipídios, de modo que a eficiência de absorção através

destas superfícies está diretamente relacionada à solubilidade lipídica da substância (Neifer & Stamper, 2009).

Os anestésicos e sedativos são importantes nas diferentes atividades relacionadas com a produção e comercialização de peixes, utilizando-se concentrações adequadas de anestésicos para as diferentes atividades normalmente estressantes durante a manipulação dos peixes (Ross & Ross, 2008). Esse estresse pode ser induzido por fatores físicos, que podem provocar várias respostas fisiológicas negativas (Barton, 2002), e com o uso de anestésicos pode-se minimizar esses danos e proteger os animais contra lesões e infecções bacterianas, que comumente levam os animais ao óbito (Neifer & Stamper, 2009 apud Kumlu & Yanar, 1999).

Atualmente, muitas substâncias provenientes de plantas, como as que estão presentes nos óleos essenciais, estão sendo investigados como alternativa para anestesia ou sedação em peixes. Um estudo desenvolvido por Khumpirapang e colaboradores (2018) elucidou o uso dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *O. canum*, e *O. sanctum* em carpa comum (*Cyprinus carpio*), constatando que os mesmos podem ser utilizados de em peixes como anestésico, nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/L, por um tempo máximo de 20 minutos. Além disso, através de testes in vitro de citotoxicidade com células sanguíneas periféricas de carpas comum nas concentrações de 100, 200, 300, 400, and 500 mg/L, atestaram que nas concentrações maiores, houve um aumento na citotoxicidade nessas células.

Além disso, diversas pesquisas no panorama dos OEs têm sido realizadas para utilização a curto e longo prazo, por exemplo, anestésicos eficazes devem induzir a anestesia dentro de 15 minutos (min) e, preferencialmente, num tempo menor que 3 min, com uma recuperação de 5 min ou menos (Marking & Meyer 1985), com uso preferencial para amostragem de sangue. Já os de longo prazo de recuperação tem sido recomendado para cirurgia e transporte de peixes (Roubach et. al, 2005 apud Hoseini et.al, 2018).

Um estudo desenvolvido por Souza et. al (2018) com OEs de *Citrus x aurantium*, nas concentrações de 100, 200, 400, 600 or 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ *Citrus x latifolia* nas concentrações de 100, 200, 300, 400 or 500 $\mu\text{L L}^{-1}$, em jundiás (*Rhamdia quelen*), com um tempo curto de exposição de 5 min e recuperação de até 10 minutos, constatou o

efeito de sedação leve desses óleos essenciais nas menores concentrações, e as maiores concentrações diminuíram o tempo de indução de sedação e anestesia.

Outro estudo desenvolvido por Santos et al (2017), com os OEs de *Aloysia triphylla* e *Cymbopogon flexuosus* em jundiás, também a curto prazo (3 min para indução anestésica e 5-10 minutos de recuperação), nas concentrações de (25, 150 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$), onde ambos os OEs induziram sedação na menor concentração e anestesia nas maiores concentrações, onde *C. flexuosus* induziu os estágios iniciais da anestesia (I e II) mais rapidamente, mas também resultou em tempos de recuperação anestésica mais longos.

Quanto a longo prazo de exposição no transporte (4 horas), (Salbego et. al, 2017) utilizou os óleos essenciais de eugenol (1,5 ou 3,0 mL L^{-1}) e *Lippia alba* (10 ou 20 mL L^{-1} , onde ambos os anestésicos reduziram a atividade cerebral da AChE, nas concentrações testadas, além de aumentar os níveis do antioxidante de grupos tiol não proteicos (NPSH) e diminuir os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.

Quanto ao potencial anestésico do óleo essencial de gengibre, um estudo realizado com o óleo essencial extraído do rizoma de uma planta da mesma família (*Alpinia galanga*), em carpa comum (*Cyprinus carpio*), nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 mg/L , a curto prazo (tempo de observação máxima de 20 minutos), demonstrou que é uma fonte natural alternativa promissora para anestesia leve em peixes, em uma concentração de 300 mg/L , devido à segurança e eficácia (Khumpirapang et al, 2018).

1.5 Radicais livres e atividade antioxidante

A oxidação é parte fundamental do nosso metabolismo e os radicais livres são produzidos naturalmente. No organismo, os radicais livres cujo elétron está desemparelhado, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Barreiros & David, 2006). Existem diferentes espécies radicais livres: radicais centrados em oxigênio, radicais centrados em nitrogênio, centrados no carbono e centrados no enxofre (Halliwell, 2007).

No entanto, o excesso dessas substâncias altamente reativas é capaz de iniciar auto amplificação e reações em cadeia causando danos e disfunção celular (Perrone et.al, 2018). A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir ou amenizar a indução de danos (Sies, 1993). Os antioxidantes são os agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (Bianchi & Antunes, 1999).

Os antioxidantes atuam através de três possíveis mecanismos, sendo eles: 1) captura direta de espécies reativas, via captura de elétrons e transferência do radical hidrogênio, 2) neutralização através de reações redox, 3) através da oxidação de substratos. Baixas concentrações de diversos OE provaram ser benéficas como antioxidantes, no entanto, em altas concentrações, a liberação de radicais hidrogenados de sítios fenólicos ativos, que podem eventualmente causar oxidação, levando a um efeito de oxidação induzido por antioxidantes (Islam et. al, 2018). Na primeira linha de defesa antioxidante do organismo estão as enzimas antioxidantes.

A superóxido dismutase (SOD) possui dois tipos de enzimas, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A catalase (CAT) converte o peróxido de hidrogênio em água (H₂O) e oxigênio (O₂). Outro sistema inclui a Glutathione Peroxidase (GPx) e GR (Glutathione Redutase), que também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂, esta enzima opera em ciclos entre sua forma oxidada e reduzida (Barreiros & David, 2006). Quanto aos biomarcadores de estresse oxidativo na lipoperoxidação lipídica, os hidroperóxidos têm efeitos danosos sobre as células através da degradação a hidroxila, altamente tóxica. Eles também podem reagir com metais de transição e danificar as membranas celulares (Maritim et. al, 2018).

1.5.1 Atividade antioxidante do OE de gengibre

Alguns OEs possuem propriedades antioxidantes, e desempenham um papel nas atividades biológicas, dependendo da sua fonte botânica e de fatores ambientais, tais como clima, e estação do ano, pois pode afetar a composição dos compostos extraídos,

que reflete em diferentes mecanismos de atividade antioxidante (Pauli & Schilche, 2009).

Um desses OEs é o de gengibre (Figura 2), onde estudos prévios (Dugasani et al, 2010) in vitro, com células RAW 264.7 expostas a compostos isolados do gengibre ([6]-Gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol), atestaram que o 6-shogaol o composto mais promissor com potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Lee e colaboradores (2011), elucidaram o papel do [6]-Gingerol nos danos oxidativos e nitrosativos induzidos por A β e apoptose, relacionado a doença de Alzheimer, em células SH-SY5Y, onde o composto apresentou capacidade protetiva contra a citotoxicidade induzida por A β , regulando positivamente os níveis de mRNA e proteína de enzimas antioxidantes.

Os estudos in vivo demonstraram a atividade antioxidante do OE de gengibre, (Jafarinejad et. al, 2017) em carpas comum (*Cyprinus carpio*) nas concentrações de 0,5, 2 e 5% de gengibre em pó por 56 dias, depois desse período de exposição, os níveis de SOD, CAT e GPx e malondialdeído (MDA), aumentaram (2 e 5%) melhorando a capacidade antioxidante. Yılmaz & Ergün (2012) atestam a atividade antioxidante do gengibre (Yılmaz & Ergün 2012) em badejo (*Dicentrarchus labrax*), utilizando um tratamento de imersão em banho de 96 horas, na concentração de 0.01 - 0.02 mL/L.

1.6 Acetilcolina e Acetilcolinesterase

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor de sinapses no sistema nervoso central (SNC). É uma substância absorvida pelas células colinérgicas através de um sistema de absorção de colina dependente de sódio, e sua ação é mediada pelos receptores nicotínicos e muscarínicos (Van der Zee & Luiten, 1999).

A neurotransmissão colinérgica central altera predominantemente a excitabilidade neuronal, altera a liberação pré-sináptica de neurotransmissores e coordena o disparo de alguns grupos de neurônios, sendo a ACh um neurotransmissor excitatório no sistema periférico (Picciotto et al, 2012) com diversas atividades, como neuritogênese, hematopoiese e trombopoiese, adesão celular, ativação dos neurônios dopaminérgicos (Soreq & Seidman, 2001).

A colinesterase é uma família de enzimas que catalisa a hidrólise da ACh em colina e ácido acético em uma reação que resulta no retorno do neurônio colinérgico ao seu estado de repouso após ativação. A Acetilcolinesterase (AChE) é encontrada em muitos tipos de tecido condutor: nervo e músculo, tecidos centrais e periféricos, fibras sensoriais, colinérgicas e não-colinérgicas, e sua atividade é maior em neurônios motores do que nos neurônios sensoriais (Colovic et al, 2013).

A terminação da ativação dos receptores de ACh é normalmente dependente da dissociação da acetilcolina de receptor e sua posterior difusão e hidrólise, exceto em doenças onde os níveis de acetilcolina são limitantes ou sob inibição da AChE, condição que aumenta a duração da ativação do receptor (Soreq & Seidman, 2001), pois impede a enzima colinesterase de quebrar ACh, aumentando tanto o nível quanto a duração da ação do neurotransmissor, e conseqüentemente, os efeitos da acetilcolina, causando seu acúmulo nas sinapses. Essa inibição é geralmente via síntese química ou produzido por plantas e microorganismos, e pode ter aplicações no tratamento de doenças neurodegenerativas e distúrbios (Su et. al, 2017).

Estudos relacionados a atividade da AChE demonstraram uma inibição dessa enzima por óleos essenciais, que é explicada pela variedade de componentes químicos em um determinado OE, Lopez et. al (2015) utilizou como modelo a enguia elétrica (*Electrophorus*) e compostos presentes nos OEs, como monoterpenóides (geraniol, linalol, cânfora, fenchone, carvona e c-terpineno) e fenilterpenóides (trans-anethole e estragol). A atividade da AChE aumentou (15–35%) com 40l M de geraniol, cânfora, c-terpineno e linalol, a atividade diminuiu (60-40%) com 5 mM de carvona, c-terpineno e fenchona, onde a AChE foi capaz de alojar mais de uma molécula monoterpenóide.

Tundis e colaboradores (2012) também avaliaram a capacidade anti colinesterásica de OE hidrodestilados de três espécies de Citrus, porém *C. aurantifolia* Swingle na concentração de 139.3 µg/mL, *C. aurantium* L. na concentração de 147.5µg/mL, foram as mais efetivas. Os OEs também apresentaram alto teor de terpenóides, sendo indicados como potenciais fármacos anticolinesterásicos.

1.7 Regulação iônica em peixes de água doce

A osmorregulação é um processo que controla as concentrações de eletrólitos e substâncias orgânicas dissolvidas em fluídos corporais e mantém o equilíbrio de sal e água (Ghahremanzadeh et.al, 2014 apud Jurd 2000). Peixes, como outros vertebrados osmorreguladores, tem que manter a homeostase iônica e osmótica, para funcionamento normal de atividades celulares e processos fisiológicos. Isto se dá através de sofisticados mecanismos de transporte transepitelial (Guh et.al, 2015). Os peixes teleósteos, especificamente, são capazes de manter a homeostase iônica e osmótica através das salinidades ambientais, utilizando os mecanismos osmorregulatórios, que são processos que demandam energia (Sampaio & Bianchini, 2002).

Esses animais mantêm a osmolaridade do organismo em aproximadamente um terço da água do mar. O sangue e os fluídos corporais dos peixes de água doce são altamente concentrados em comparação com o meio e há uma tendência de a água entrar no corpo por osmose, e sais serem perdidos pela difusão passiva (Eddy, 1982). Portanto, eles enfrentam continuamente dois desafios: (1) minimizar as perdas iônicas passivas via vias paracelulares e (2) para absorver ativamente íons do ambiente diluído (Kumai & Perry, 2012).

A modificação que ocorreu durante a evolução do epitélio dos peixes para facilitar a troca gasosa não é sem custo fisiológico, pois o ambiente aquático exacerba qualquer movimento difusional de substâncias dissolvidas ou água dentro ou fora de um organismo que não seja iso-osmótico em relação ao meio (Evans et. al, 1999).

A osmorregulação em peixes é mediada por um conjunto de estruturas, incluindo o epitélio gastrointestinal, o rim, e as brânquias, que criam gradientes iônicos e osmóticos entre o corpo e o ambiente externos (Kaneko et.al, 2002). Dentre eles, as brânquias são o principal local de troca iônica para equilibrar ganhos ou perdas pela difusão (Evans et. al, 1999).

Nos peixes de água doce, existem dois tipos de células, as pavimentosas (90% da superfície total epitelial) e os ionócitos, que se encontram nas superfícies lamelares do filamento de brânquia, e são células ricas em mitocôndrias, que são as principais células que expressam transportadores de íons específicos (ou enzimas) e, portanto, são responsáveis pelo transporte de íons (principalmente absorção de sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e cálcio (Ca^+), secreção de íons hidrogênio (H^+) ou bicarbonato (HCO_3^-) e excreção

de amônio (NH_4^+) nas brânquias de peixes de água doce (Guh et.al, 2015; Perry et. al, 1998).

A captação de Na^+ e Cl^- é realizada por transportadores de Na^+/H^+ e $\text{NaCl}^-/\text{HCO}_3^-$ com mecanismos de troca iônica (Wilson et.al, 2000 apud Krogh, 1939). A ionorregulação no transporte simulado pode sofrer alterações no fluxo iônico de Na^+ , Cl^- e K^+ , provocada pelo stress nos peixes, com perturbação da homeostase iônica, além de estimular a glicogênese, a gliconeogênese, o catabolismo proteico e a produção de amônia (Randall Ip & Chew 2010).

Durante um equilíbrio equivalente de ácido-base metabólico, o fluxo de íons dos compartimentos extracelular e intracelular para o ambiente externo, pode ser estimado, para saber a diferença entre os ânions e cátions do peixe para a água. Em geral, isso estará próximo da diferença entre os fluxos iônicos de Na^+ e Cl^- pois esses são os principais íons nos sistemas fisiológicos extracelulares. Além disso, o fluxo iônico de um íon entre o peixe e a água pode ser estimado através do influxo e o efluxo. Mudanças de qualquer um desses dois componentes vai alterar o fluxo iônico desse íon e, portanto, afetar o equilíbrio ácido-base (Goss et. al, 1992).

1.7.1 Íon sódio (Na^+)

A homeostase do sódio regula o volume do líquido extracelular. Sua manutenção requer um equilíbrio entre a captação e a excreção de Na^+ . No caso do metabolismo na água, é possível definir componentes reguladores e não reguladores dessas duas funções (Verbalis, 2014). A absorção de Na^+ é mediada por transportador de troca Na^+/H^+ que é direta ou indiretamente acoplada e apresenta cinética de saturação. Os níveis de Na^+ no epitélio são tipicamente maiores em água doce, onde o gradiente químico do Na^+ é insuficiente para conduzir a troca Na^+/H^+ (Wilson et al, 2000 apud Avella & Bornancin, 1989).

A secreção de ácidos (H^+ e/ou NH_4^+) está ligado à absorção transepitelial de Na^+ enquanto a secreção de bases (HCO_3^- e/ou OH^-) é independentemente ligada à absorção transepitelial de Cl^- . Até agora, pelo menos dois modelos foram propostos para o transporte apical de Na^+ : (1) tipo-V apical de H^+ -ATPase eletricamente ligada ao

Na^+ , com absorção via canal de Na^+ epitelial, e (2) uma troca eletroneutra de Na^+ e H^+ via transportador apical Na^+/H^+ (Hwang & Lee, 2017).

1.7.2 Íon cloro (Cl^-)

O Cl^- é um halogênio aniônico inorgânico que é distribuído exclusivamente dentro do compartimento do líquido extracelular, que compreende o compartimento de sangue/plasma (ou soro), e o compartimento do líquido intersticial. É importante na manutenção da eletroneutralidade e da osmolalidade, juntamente com o sódio, por isso, mudanças nos níveis de cloro sempre devem associadas a alterações nas concentrações de Na^+ proporcionalmente (Dyozen et.al, 2014).

Os ionócitos e a Na^+/K^+ ATPase, em conjunto com outras células epiteliais branquiais, são capazes de extrair Na^+ e Cl^- contra uma grande concentração de gradiente, mas ao mesmo tempo, Na^+ e Cl^- são difundidos dos fluídos corporais para a água (Eddy et al, 1982). O mecanismo de captação de Cl^- envolve a troca na membrana apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, e o influxo de Cl^- foi demonstrado como sendo estimulado por infusão de HCO_3^- (Kerstetter e Kirschner, 1972), e há uma boa correlação entre as taxas de absorção de Cl^- e secreção de bases (de Renzis e Maetz, 1973).

1.7.3 Íon potássio (K^+)

O K^+ é um importante cátion monovalente nos animais vertebrados. Quase todas as células possuem uma enzima Na^+/K^+ -ATPase, que bombeia Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro da célula e isso leva a um gradiente de K^+ através da membrana celular, que é parcialmente responsável por manter a diferença de potencial através da membrana (Palmer, 2015).

Por causa da ação dessa enzima nas membranas celulares das brânquias, os níveis de K^+ intracelular são mantidos 20 vezes mais elevados que os extracelulares (Dang et al., 2000; Horng et.al, 2017). Ao contrário de Na^+ e Cl^- , que são absorvidos por hiper osmorregulação, em peixes, o K^+ é secretado através de um canal próprio, ortólogo ao medular externo renal nos mamíferos (Horng et.al, 2017). Em peixes de

água doce, há um pequeno gradiente de K^+ entre o plasma e o ambiente, pode limitar a capacidade de efluxo passivo desse íon, através da pele e brânquias, ou mesmo permitir influxo dirigido por potenciais elétricos (potencial transepitelial). Altos níveis de K^+ intracelular não favorecem sua captação via transcelular (Horng et.al, 2017).

1.9 Referências

Ali, B.H.; Blunden, G.; Tanira M.O.; Nemmar, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.): A review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 409-420, 2008.

Amorozo, M.C.M. (2002) A perspectiva etnobotânica na conservação de biodiversidade. In: **XIV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo. Biodiversidade: os desafios da botânica para o Estado de São Paulo**. Rio Claro, São Paulo. p. 1-2, 2002.

Andrade, M.A.; Cardoso, M.G.; Batista, L.R.; Mallet, A.C.T.; Machado, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Rev. Ciênc. Agron.** v. 43, p. 399-408, 2012.

Avella, M.; Bornancin, M. A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.** 142, 155–175, 1989.

Azambuja, C.R.; Mattiazi, J.; Riffel, A.P.K.; Finamor, I.A.; Garcia, L.O.; Heldwein, C.G.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B., Pavanato, M.A; Lesuy, S.F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156-161, 2011.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446–475, 2008.

Barreiros, A.L.B.S.; and David J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

Barton, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integr Comp Biol.**v. 42, p. 517-525, 2002.

Bozkurt, Y.; Gül, A.; Balcı, B.A.; Çetin, N.C. "Importance of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) for Controlling of Aquatic Vegetation." Grasses-Benefits, Diversities and Functional Roles. **Intech Open**, 2017.

Brander, K.M. Global fish production and climate change. **Proceedings of the National Academic Sciences**, v. 104, p. 19709–19714, 2007.

Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 4, p. 223–253, 2004.

Baser, K.H.C; Buchbauer, G.; Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications, **CRC Press, Boca Raton, FL, USA**, 2010.

Camargo, J.B.J.; Neto, J.R.; Emanuelli, T.; Lazzari, R.; Costa, M.L.; Losekann, M.E.; Lima, R.L.; Scherer, R.; Augusti, P.R.; Pedron, F.A.; Medeiros, T.S. Cultivo de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) alimentados com ração e forragens cultivadas. **R. Bras. Agrociência**, 12, 211-215 2006.

Chilton, E.W. & Muoneke, M.I. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: a North American perspective. **Rev. Fish Biol.** Fish. 2, 283–320,1992.

Colovic, M.B.; Krstic, D.Z; Larazevic- Pasti, T.D.; Bondzic, A.M.; Vasic, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Neuropharmacology**, v. 11, p. 315-335, 2013.

Conover, G.; Simmonds, R.; Whalen, M. editors. Management and control plan for bighead, black, grass, and silver carps in the United States. **Asian Carp Working Group, Aquatic Nuisance Species Task Force**, Washington D.C.223, 2007.

Dang, Z.; Lock, R.A.C.; Flik G.; S. Bonga W. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **J. Exp. Biol.**, v. 20, p. 370-387, 2000.

Dzoyem, J. P.; Kuete, V.; Eloff, J. N. Biochemical parameters in toxicological studies in Africa: significance, principle of methods, data interpretation, and use in plant

screenings. In **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p. 659-715. Elsevier, 2014.

Eddy, F.B. Osmotic and ionic regulation in captive fish with particular reference to salmonids. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 73B, p. 125-141, 1982.

Elshafie, H.S.; Camele, I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. **BioMed Research International.** v. 2017, p. 1-14, 2017.

Filho, V.C.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1997.

Foskett, K.; Bern, H.A.; Machen, T.E.; Conner, M. Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. **J. exp. Biol.** v.106, p. 255-281, 1983.

Fouda, A.M.; Berika, M.Y. Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes in rat collagen-induced arthritis. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v, 104 p. 262–271, 2009.

Garcia, L.O.; Copatti, C.E; Wachholz F, Filho, W.P; Baldisserotto, B. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v. 6(2), p. 275-281, 2008.

Garcia, L.O.; Barcellos, L.J.G.; Baldisserotto, B. Fluxo de íons e excreção de amônia durante o transporte juvenis de *Rhamdia quelen*. **Cienc. Rural**, v. 45, 2015.

Ghasemzadeh, A.; Jaafar, H.Z.; Rahmat, A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules.** v. 15, p. 6231–6243, 2010.

Ghahremanzadeh, A.; Namin, J.I.; Bani, A.; Hallajian, A. Cytological comparison of gill chloride cells and blood serum ion concentrations in kutum (*Rutilus frisii kutum*) spawners from brackish (Caspian Sea) and fresh water (Khoshkrood River) environments. **Arch. Pol. Fish.**v. 22, p. 189-196, 2014.

Grzanna, R., Lindmark, L., Frondoza, C. Ginger—an herbal medicinal product with broad antiinflammatory actions. **J. Med. Food**, v. 8, p. 125–132, 2005.

Goss, G. G.; Perry, S.F.; Wood, C.M.; Laurent, P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 263(2), p. 143-159, 1992.

Guenther, E. In *The Essential Oil* vol. **IV. D.Van Nostrand: New York**, 1950.

Guh, Y. J.; Lin, C. H.; Hwang, P. P. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. **EXCLI journal**. v. 14, p. 627-659, 2015.

Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

Hoseini, S.M.; Mirghaed, A.T.; Yousefi, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture.**Reviews in Aquaculture**, p. 0-15, 2018.

Hornig, J. L.; Yu, L. L.; Liu, S. T.; Chen, P. Y.; Lin, L. Y. Potassium Regulation in Medaka (*Oryzias latipes*) Larvae Acclimated to Fresh Water: Passive Uptake and Active Secretion by the Skin Cells. **Scientific reports**. v. 7(1),p. 16215, 2017.

Hwang, P.P.; Lee, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 148(3),p. 479-497, 2007.

Islam, M.T.; Ali, E.S.; Uddind, S.J.; Shawe, S.; Islamd, M.A.; Ahmedd M.I.; Shillf, M.C.; Karmakard, U.K.; Yarlaga, N.S.; Khanh I.N.; Billahi M.M.; Pieczynskaj, M.D.; Zengink, G.; Malainerl, C.; Nicolettim, F.; Gulein, D.; Berindan-Neagoen, I.; Apostolovq, A.; Banachr, M; Yeung, A.W.K.; El-Demerdashv, A.; Xiaox, J.; Deyy, P.; Santosh Yelez, S; Jóźwikj, A.; Strzałkowskaj, N.; Marchewkaj, J.; Rengasamyaa, K.R.R.; Horbańczukj, J.; Kamalac, M.A; Mubarakab, M.S.; Mishra, S.K.; Shilpid, J.A.; Atanasov, A.G. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 82–94, 2018.

Jafarinejad, R.; Gharaei, A.; Harijani, M.J. Dietary ginger improve growth performance, blood parameters, antioxidant capacity and gene expression in *Cyprinus carpio*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, p. 1-17, 2018.

Kamaliroosta, Z.; Kamaliroosta, L.; Elhamirad, C A.H. Isolation and Identification of Ginger Essential Oil. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 3, p. 73-80, 2013.

Kaneko, T.; Shiraishi, K.; Katoh, F.; Hasegawa, S.; Hiroi, J. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. **Fisheries science**. v. 68(1),p. 1-9, 2002.

Khumpirapang, N.; Pikulkaew, S.; Anuchapreeda, S.; *Alpinia galanga* oil—A new natural source of fish anaesthetic. **Aquaculture Research**. p. 1–11, 2018.

Khumpirapang, N.; Pikulkaew, S.; Anuchapreeda, S.; Okonogi, S. Anesthetic activity of plant essential oils on *Cyprinus carpio* (koi carp). **Drug Discoveries & Therapeutics**. v. 12, p. 21-30, 2018.

Kiuchi, F.; Shibuya, M.; Sankawa, U. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. **Chem Pharm Bull**, v.30, p. 754–757, 1982.

Krogh, A. Osmotic Regulation in Aquatic Animals. London: **Cambridge University Press**, 1939.

Kumai, Y.; Perry, S. F. Mechanisms and regulation of Na⁺ uptake by freshwater fish. **Respiratory physiology & neurobiology**, 184(3), 249-256, 2012.

Lee, C.; Park, G.H.; Kim, C.; Jang, J. [6]-Gingerol attenuates b-amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 1261–1269, 2011.

López, M. D.; Campoy, F. J.; Pascual-Villalobos, M. J.; Muñoz-Delgado, E.; Vidal, C. J. Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. **Chemico-biological interactions**, v.229, p. 36-43, 2015.

Majolo, C.; Nascimento, V.P.; Chagas, E.C.; Chaves, F.C.M. Antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* rhizomes against enteric Salmonella isolated from chicken. **Rev. bras. plantas med.** v.16 , 2014.

Marking, L.L.; Meyer, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**. v.10, p.2–5, 1985.

Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkin, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **J Biochem Molecular Toxicology**. v. 17, p. 24-38, 2018.

Marques, E.S.; Froder, J.G.; Carvalho, J.C.; Rosa, P.C.; Perazzo, F.F.; Maistro, E.L.; Evaluation of the genotoxicity of *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae) fruit oil (açai), in mammalian cells in vivo. **Food Chem Toxicol.**; v. 93, p. 9-13, 2016.

Martins, T.; Diniz, E.; Félix, L.M.; Antunes, L. Evaluation of anaesthetic protocols for laboratory adult zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**. v. 13, p. 1-12, 2018.

Meade, M.E., Doeller, J.E., Kraus, D.W.; Watts, S.A. Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, p. 188-198, 2002.

Miyashima, A.; Kotani, T.; Tawa, H.; Fushimi, H. Relationship between oxygen consumption, growth and survival of larval fish. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 679–687, 2012.

Mbaveng, A.T. e Kuete, V. *Zingiber officinale*. In: **Kuete, Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases**. 2017

Neiffer, D.L. e Stamper, M.A. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. **ILAR Journal**, v. 50, p. 343-360, 2009.

Neric, C.; Merino, G. Silva, A. Effects of two temperatures on the oxygen consumption rates of *Seriolella violacea* (palm fish) juveniles under rearing conditions. **Aquacultural Engineering**, v. 48, p. 40-46, 2012.

Pauli, A.; Schilche H. “In Vitro Antimicrobial activities of essential oils monographed in the European pharmacopoeia,” in Handbook of essential oils; **Science, Technology, and Applications**. v. 12, p. 353–547, 2009.

Pereira, J.A.; de Souza, T.B; Gomes, L.C. Oxygen consumption of *Astyanax* sp. as function of temperature and oxygen concentration. **Natureza on line**,v. 12, p. 216-219, 2014.

Perrone, S.; Santacroce, A.; Longini, M.; Proietti, F.; Bazzini, F.; Buonocore ,G. The Free Radical Diseases of Prematurity: From Cellular Mechanisms to Bedside. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2018.

Perry, S.F. Relationships Between Branchial Chloride Cells and Gas Transfer in Freshwater Fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 119A, p. 9–16, 1998.

Picciotto, M.R, Higley, M.J, Mineur, Y.S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, p.116-129, 2012.

Pípalová, I.; Květ, J.; Adámek, Z. Limnological changes in a pond ecosystem caused by grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) low stocking density. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 54, p. 31–45, 2009.

Pörtner, H.O. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems **J. Exp. Biol.**,v. 213, p. 881-893, 2013

Randall, D.J. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **Journal Experimental Biology**, v. 100, p. 275-288, 1982.

Randall, D.J.; Tsui, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p.17-23, 2002.

Romaneli, R.S.; Boaratti, A.Z.; Rodrigues, A.T.; Queiroz, D.M.A.; Khan, K.U.; Nascimento ,T.M.T.; Fernandes, J.B.K. Efficacy of Benzocaine, Eugenol, and Menthol as Anesthetics for Freshwater Angelfish. **Journal of Aquatic Animal Health**. 2018.

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

Roubach. R.; Gomes, L.C.; Leão, Fonseca F.A.; Val, A.L Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1056–106, 2005.

Salbego, J.; Toni, C.; Becker, A.G.; Zeppenfeld, C.C.; Menezes, C.C.; Loro, V.L.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia*

quelen) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Braz. J. Biol.** v. 77, p. 696-702, 2017.

Sampaio, L. A. and Bianchini, A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 269, p. 187-196, 2002

Santos, A.C.; Junior, G.B.; Zago, D.C.; Zeppenfeld, C.C.; da Silva D.T.; Heinzmann, B.M., da Cunha, M.A. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Vet Anaesth Analg** .v. 44, p. 106-13, 2017.

Schmidt-Nielsen, K. The Standard Metabolic Rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23,p. 49-53, 2002.

Shukla, Y.; Singh, M. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p. 683-690, 2007.

Shireman, J.V; C.R. Smith. Synopsis of biological data on the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Cuvier and Valenciennes, 1844). **Food and Aquaculture Organization Synopsis**. v. 135, p. 1-86 , 1983.

Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p.213-219, 1993.

Silva, A.F.; Cruz, C.; Pitelli, R.L.C.M.; Pitelli, R.A. Use of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) as a biological control agente for submerged aquatic macropytes. **Planta Daninha, Viçosa-MG**. v. 32, p.765-773, 2014.

Silva, F.T.; Cunha, K.F.; Fonseca, L.M.; Antunes, M.D.; Halal, S.L.M.E.; Fiorentini, A.M.; Zavarese, E.R.; Dias, A.R.G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control *in situ*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.11, p. 107-115, 2018.

Silveira, P.F.; Bandeira, M.A.M.; Arrais, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18. p. 618-626, 2008.

Srinivasan, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. **PharmaNutrition**, v. 5, p. 18–28, 2017.

Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Macmillan Magazines Ltd**, v.2, p 294-302, 2001.

Souza, C.F.; Baldissera, M.D.; Salbego, J.; Lopes, J.M.; Vaucher, R.A.; Mourão, R.H.V.; Caron, B.O.; Heinzmann, B.M.; da Silva, L.V.F.; Baldisserotto, B. Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. **Neotrop. ichthyol.** v.15, 2017.

Souza, C.F.; Schindler, B.; Pinheiro, C.G.; Salbego, J.; Siqueira, J.C.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto, B. 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*). **Neotrop. ichthyol.**, v. 16, 2018.

Souza, C.F.; Salbego, J.; Gressler, L.T.; Golombieski, J.I.; Ferst, J.G.; Cunha, M.A.; Heinzmann, B.M.; Caron, B.O.; Glanzner, W.G.; Gonçalves, P.B.D.; Baldisserotto, B. *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotrop. ichthyol.** v.13, 2015.

Sterzelecki, F.C.; Rodrigues, E.; Fanta, E.; Ribeiro, C.A.O. The effect of salinity on osmoregulation and development of the juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* (POEY). **Braz. J. Biol.**, v. 73, p. 609-615, 2013.

Stevanovi'c, Z.D.; Bošnjak-Neumüller, J.; Paji'c-Lijakovi'c, I.; Raj, J.; Vasiljevi'c, M. Essential Oils as Feed Additives—Future Perspectives. **Molecules**. v. 23, p. 1-20.

Stoilova I.; Krastanov A.; Stoyanova A.; Denev P.; Gargova S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 764–770, 2007.

Su, J.; Liu, H.; Guo, K.; Chen, L.; Yang, M.; Chen, Q. Research advances and detection methodologies for microbe-derived acetylcholinesterase inhibitors: a systemic review. **Molecules**, v. 22(1), p. 1-24 , 2017.

Suvetha, L.; Ramesh, M.; Saravanan, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, p. 44-49, 2010

Swanson, E.D.; Bergersen, E.P. Grass carp stocking model for coldwater lakes. **N.Am J. Fish Manag.** v.8,p. 284–291, 1988.

Verbalis, J. G. Disorders of water metabolism: diabetes insipidus and the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. In **Handbook of clinical neurology** (v. 124, p. 37-52). Elsevier, 2014.

Tripathi, S. D.; Datta, A. K. Effects of species proportion and stocking density on growth and production in carp polyculture. **Aquaculture hungarica, Budapest** v.6, p. 203- 209, 1990.

Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Colica, C.; Menichini, F. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. **Journal of food Science** ,v. 77(1), p. 40-46, 2012.

Van der Zee, E.A, Luiten, P.G.M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 58, p. 409 -471, 1999.

Verigin, B.V.; Makeyeva A.P.; Mokhamed I.Z. Natural spawning of the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), the bighead carp (*Aristichthys nobilis*), and the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in the Syr-Darya River. **Journal of Ichthyology**. v. 18, p. 80-92, 1978.

Wang, Y.; Lu, Y.; Zhang, Y.; Ning, Z.; Li, Y.; Zhao, Q.; Lu, H.; Huang, R., Xia, X.; Feng, Q. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. **Nat. Genet.**, 47: 625-631, 2015

Wilson, J.M.; Pierre, L; Tufts, B.L.; Benos, D.J.; Donowits, M.; Vogl, A.W.; Randall, D.J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 2279–2296, 2000.

Yılmaz, S.; Ergün, S. Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. **J Aquat Anim Health**. v. 24, p. 219–224, 2012.

Zhang Y.L.; Zheng, Y.M.; Hu, S.N.; Liu, H. Anti-Helicobacter pylori effect of 6-gingerol in vitro. **Modern Food Sci. Technol.**, v.29, p. 1259-1261, 2013.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo e de osmorregulação em carpas capim (*C. idella*), expostos ao óleo essencial de gengibre (*Z. officinale*)

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se as concentrações utilizadas do óleo essencial alteram parâmetros osmorregulatórios (fluxo iônico) nesta espécie.
- Avaliar se a exposição ao óleo essencial modifica parâmetros metabólicos enzimáticos antioxidantes e de lipídios e proteínas, remetendo ao possível potencial antioxidante.
- Verificar se o óleo essencial de gengibre altera parâmetros enzimáticos na atividade da enzima Acetilcolinesterase.

A presente dissertação está estruturada de acordo com as normas da Universidade Federal de Santa Maria (MDT), sendo composta por um manuscrito.

3 DESENVOLVIMENTO

Manuscrito: Descreve as atividades e protocolos de laboratório realizados para mensurar os efeitos do óleo essencial de gengibre em carpas.

Manuscrito encaminhado para a revista *Physiological and Biochemical Zoology*.

Manuscrito - Antioxidant effects of *Zingiber officinale* essential oil on grass carp

(*Ctenopharyngodon idella*)

Milena Fortuna¹, Carine de Freitas Souza², Marisa Teresinha de Bastos Brasil³, Elisia Gomes da Silva¹, Mauro Alves da Cunha*¹

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul

97105-900, Brazil

e-mail: milena.fortunaz@gmail.com;

elisia.biomedicina@hotmail.com;

cunha.mauroalves@gmail.com

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul

97105-900, Brazil

e-mail: carinedefes@yahoo.com.br

³ Departamento Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul

97105-900, Brazil

e-mail: marisabbrasil@yahoo.com.br

*Corresponding author: (55) 55 3220-9382, e-mail:
cunha.mauroalves@gmail.com

Key words: Fish, Ginger, Oxidative stress, Plants

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale*) has several beneficial effects already investigated, in species like Wistar rats and fish (*Cyprinus carpio*). In the organism, the harmful effect of free radicals (ROS) occurs when they are in excessive amounts and the antioxidants combat this effect. The Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), is the one of the most important and most highly consumed freshwater fish species in the world. The aim of the present study was to investigate the effects of ginger essential oil as an antioxidant, considering the physiology of grass carp. For this, the parameters evaluated were biochemical, blood, ion flow and acetylcholinesterase (AChE). Data are reported as mean \pm SE. No mortality was registered for the duration of the experiments. Plasma glucose and protein levels did not differ significantly among the groups, as acetylcholinesterase in brain and muscle. On the three sampling times and two concentrations EOG tested, SOD activity was significantly higher in the liver (17.36 ± 3.14 , 17.19 ± 3.67) and in the kidney (15.97 ± 2.42 , 16.48 ± 2.95), when compared to the control group (14.63 ± 0.92 , 14.09 ± 0.65), except for SOD activity in the liver after 1 hour (11.41 ± 3.42 , 11.55 ± 1.58). GPx levels began to increase in the liver at 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ from 4 hours of treatment (23.38 ± 0.65) to 8 hours (24.63 ± 4.82) at the concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, after 8 hours of exposure in the kidney (39.74 ± 7.62). The concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ induced the stage of light sedation, after 1 hour which lasted up to 8 hours. The ion flux of potassium (K^+) had an influx on the concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ as the ion chloride (Cl^-) at 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. The EOG induces the enzyme antioxidant activity at both concentrations, improving oxidative levels, and has a light sedation after 8 hours of exposition.

Key words: Fish, Ginger, Oxidative stress, Natural Product

Introduction

Medicinal plants are very useful in aquaculture because they have natural organic components that help reducing the mortality of fishes because of various pharmacological actions (Jafarinejad, 2018). In this context, the essential oils (EO) are aromatic and volatile oil liquids containing a mix of compounds resulting from the secondary metabolism of the plant formed in special cells found in leaves and stems, commonly concentrated in a particular region such as leaves, bark or fruit and have been used as sources of medication (Burt, 2004). In this way, the use of essential oils has been shown to be a viable alternative to such adversities in the use of synthetic anesthetics (Façanha & Gomes, 2005, Palic et al, 2006) and to attenuate the damage caused by oxidative stress.

In recent years, the properties of a variety of essential oils with this proprieties have been investigated to provide effective anesthesia and sedation in fish (Cunha et al., 2010; Parodi et al., 20113; Gressler et al., 2014; Souza et al, 2017; Souza et al., 2018; Hoseini et. al, 2018). However, each substance has advantages and disadvantages, such as the relationship between therapeutic factors and toxic effects and causing disorders in physiology (Velisek et al., 2006).

Free radicals are molecules with an unpaired electron in their outer orbit and have a very important role in the origin of life and biological evolution, leaving beneficial effects on the organisms (McCord, 2000). Overproduction free of radicals can cause oxidative damage to biomolecules, (lipids, proteins, DNA), eventually leading to many diseases (Freidovich, 1999). The antioxidant defense system, which is usually considered free radical scavengers, is another detoxification mechanism to protect an organism from oxidative stress. The first line of antioxidant enzymatic defense is composed, among others, by superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX). They are important biochemical mediators of antioxidant defenses (Wu et al, 2017).

The net ion fluxes are other parameter to determine homeostasis because freshwater fishes maintain plasma Na^+ and Cl^- levels distinctly different from the environment. They face a constant net movement of salts and water across their

permeable membrane. Thus, freshwater fishes (which are hyperosmotic to the medium) presumably face a net loss of NaCl and net influx of water (Evans et al, 1982).

Another parameter of homeostasis in fish is AchE, and their substrate is Acetylcholine (ACh) is the most widespread and best understood neurotransmitter. The primary role of AchE is to catalyze the hydrolysis of ACh in the cholinergic synapses within the central nervous system, the peripheral nervous system, and at neuromuscular junctions. When this function is inhibited, this leads to nerve signal transmission dysfunction (Carmany et al, 2018).

Ginger (*Zingiber officinale*), belonging to the family Zingiberaceae and is native to warm tropical climates, particularly southeastern Asia and is cultivated in India, China, Africa, Jamaica, Mexico, and Hawaii. Both the essential oil and oleoresins extracted from the rhizomes (spice of commerce) are used in many food preparations, soft drinks, and beverages. (Singh et al., 2008) Besides, has several beneficial effects already investigated, including anti-inflammatory and analgesic activity, (Grzanna et al. 2005) protective (Yemitan & Izebu. 2006) and radioprotective effects, (Kim et al. 2007) antioxidants (Kikasaki & Nakatani, 1993) and anthelmintic (Lin et al. 2014) so essential oil becomes a promising alternative for antioxidant effects in fish.

Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) has been the most researched and used organism in biological control of submersed aquatic weeds. It is a large (125 cm) herbivorous fish, which has been introduced to more than 50 countries for aquatic weed control and aquaculture (Sutton and Vandiver 2000). This fish is native from the large rivers of Asian east coast (Fisher & Lyakhnovich, 1973) and is the one of the most important and most highly consumed freshwater fish species in the world (He et al, 2017). Mainly due to the fast growth, low cost of breeding (Chen et al., 2012).

In this context, the objective of the present study was to determine the efficacy of EO of *Zingiber officinale* (EOZO) in sedation and antioxidant parameters, in grass carp (*C. idella*).

Materials and methods

Animals

Fifty two juvenile of grass carp were obtained from a local fish farm and taken to the laboratory of Physiology of fishes (LAFIPE) at the Federal University of Santa Maria. They were kept for 1 week in 40 L tanks with continuous ventilation for acclimation, 15 fish/tank with controlled temperature of 21° C, pH 6.5-7.5 and dissolved oxygen above 5.5 mg L⁻¹. The fish were fed twice a day with commercial feed (Supra® Juvenil). Residues of food, and feces that had accumulated at the bottom of tanks were removed daily, and 25% water renewed every two days. The experimental protocol was approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the UFSM under registration number 74/2014.

Essential oil

The ginger essential oil was purchased from company Laszlo®, extract by the roots, and the majority chemical compounds was zingiberene (31.8 %), β -sesquifelandrene (13%) ar-curcumene (12.4 %). (Table 1) The essential oil was stored in a bottle of amber material. The method used was High Resolution Gas Chromatography, where the extraction was by Steam-driven distillation. Column: HP1 25m x 0.25mm (HP). Temperatures: Column: 40 ° C (3min), 3 ° C/min, up to 150 ° C. Injector: 250 ° C Split: 1/200. FID detector: 250 ° C. Injection volume: 1 μ L (conc. 0.5% in hexane). The test was realized for the Federal University of Minas Gerais, Institut of Exact Sciences, Department of Chemistry/Extension Collegiate.

Exposure test

The concentration used (0, 50 μ L L⁻¹ and 100 μ L L⁻¹) were based on a previous study (Khumpirapang et al, 2018) with an essential oil of the same family of ginger (*Alpinia galanga*) and koi carp (*Cyprinus carpio*), in a concentration of 100 mg L⁻¹ was capable of inducing slight anaesthesia.

The duration of the tests was 8 hours. The tissue samples were collected at times: 0 (basal), 1 hour, 4 hours and 8 hours after the beginning of the tests. The aquariums containing 1L of water and different concentrations of OEZO previously diluted in ethanol (1:10) were used. There was used 4 fish per treatment (quadruplicate) removed from the aquaria and sampled immediately. Blood was collected from caudal

peduncles using heparinized capillaries. Next, the fish were euthanized by sectioning the spinal cord and the liver and kidney were carefully removed and stored at -80°C .

High concentrations of ginger essential oil (300, 600 and $800\ \mu\text{L L}^{-1}$) was tested, however, did not get results, because the water became cloudy, and we could not observe the animals.

Plasma analysis

The blood was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C , and plasma was separated and stored at -80°C until analysis. Plasma was used to determine glucose and total protein levels using a commercial kit (Bioclin®, MG, Brazil) according to manufacturer's recommendation.

Metabolites in the liver

A tissue's portion were homogenized in a ratio of 50 mg/mL of 1% TCA (trichloroacetic acid) using a Homogenizer Turrax. Subsequently, the homogenized were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min, and the supernatant was used for determining glucose levels according to the method described by Dubois et al. (1956). All data were expressed as micromol per gram of tissue.

Parameters of oxidative stress

A portion of liver and kidney was homogenized (1: 10 w v⁻¹) in a medium containing 120 mM potassium chloride and 30 mM phosphate buffer (pH 7.4) (Souza et al, 2017) and the supernatant fraction obtained was frozen at -80°C .

Prooxidants

The supernatants were used for the determination of lipid peroxidation, established by reactive thiobarbituric acid species production (TBARS), performed by reaction of malondialdehyde (MDA) with 2-thiobarbituric acid, which was measured optically according to Buege and Aust (1978) at 532 nm.

The carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), with some modifications. The carbonyl content was then measured by spectrophotometry at 370 nm. The protein concentration was determined by the Coomassie Blue Method after Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Antioxidants measure

Enzymatic antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) was determined as the inhibition rate of autocatalytic generation of adrenochrome at 480 nm (Misra and Fridovich 1972). The enzyme glutathione peroxidase (GPx) was measured through the oxidation rate of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate at 340 nm by the reaction with glutathione reductase (GR). GR activity was determined by measuring the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate at 340 nm (Carlberg & Mannervik 1985).

Brain and muscle AChE activity

Brain and muscle AChE activity were measured at the initial time and 8 hours after exposition to the EOZO, and was determined according to the method described by Ellman et al. (1961) and modified by Castro et al. (2017). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/ mL, and 0.2 mL of intact cells was added to a solution containing 1.0 mmol acetylcholine (ACh), 0.1 mmol DTNB and 0.1 mmol phosphate buffer (pH 8.0). Immediately after incubation for 2 min at 27 °C, the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE activity was calculated from the quotient between brain and muscle AChE activity and protein content.

Net flux and chloride

The water collection was 15 mL in volume, at the times of 0 (initial), after 1 hour, 4 hours and 8 hours of exposition, with aeration. The net flux was calculated according to Gonzalez et al (1998). Chloride levels were determined according to Zall et al. (1956), and the levels of Na⁺ and K⁺ were measured with a flame spectrophotometer B262 (Micronal, São Paulo, Brazil).

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SE. The homogeneity of variances between groups was tested with the Levene test. When the data were parametrical, comparisons between different groups were made using two-way analysis of variance (Time x Concentration), with factorial experiment of 4 times and 3 concentration, and the Tukey's test. Analyzes were performed using the software STATISTICA package, version 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), and the minimum level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

No mortality was registered for the duration of the experiments as a consequence of the exposure to EOZO. In this study, it was not observed the effects of deep anesthesia on the experimental period, but after 1 hour at $100 \mu\text{L L}^{-1}$ there was a light sedation that remained until 8 hours.

TBARS levels (Fig. 1) were lower on the liver 4 hours of the treatment, at both concentrations of treatment when compared to the control group, while in the kidney of carp exposed to EOZO had no significantly different TBARS values among them, and all treatments were low in comparison to the control.

In the kidney, protein carbonyl (Fig 2.) levels decreased in both concentrations after 4 hours, as the observed in TBARS, and the control group had higher levels 1 hour, at the beginning of treatment, compared to the basal group in the liver and the kidney. There were no significant differences between the concentrations in both tissues after 8 hours of treatment.

Regarding the parameters of enzymatic antioxidant activity, at three sampling times exposure to each of the ginger essential oil concentrations tested resulted in significantly higher SOD activity in the liver and kidney (Fig 3), when compared with the control groups, with the exception of the SOD activity in the liver after 1 hour. The highest levels of SOD activity in the kidney were at $50 \mu\text{L L}^{-1}$, 4 hours after exposure.

The GPx activity (Fig 4) varied among the experimental groups. Compared to control group, the levels of GPx beginning increased at $50 \mu\text{L L}^{-1}$ on 4 hours after exposure in the liver until 8 hours, and $100 \mu\text{L L}^{-1}$ 8 hours in the kidney.

Plasma glucose concentrations did not differ significantly among the groups at the same time point, as the total protein that also did not differ significantly compared to basal group (Table 2), as the AChE in brain and muscle.

Regarding to the net flux (Fig.5) measured through 8 hours, were observed an influx of the chloride ions (Cl^-) and sodium (Na^+), on the highest concentration. On the Na^+ ion, the concentration of $50 \mu\text{L L}^{-1}$ did not differ from the control group, but on the Cl^- were an efflux of these ion at the same concentration. As the potassium (K^+) levels, the minor concentration did not differ from the control group, and at $100 \mu\text{L L}^{-1}$ had an efflux of these ions.

Discussion

Sedation is a preliminary state of anesthesia in which sleepiness is induced, with numbed sensory perception and possibly some analgesia (insensitivity to pain), but in which there is no gross loss of sensory perception or balance. According Ross and Ross, (2008) there are four levels of anesthesia, being: 1- light sedation, 2- light anesthesia, 3- surgical anesthesia and 4- medullary collapse.

In slight sedation there is stimulation, but reduced movement, decreased ventilation, some analgesia, only receptive to gross stimulation. On the other hand, light anesthesia is characterized by partial loss of balance; good analgesia, total loss of muscle tone, total loss of balance, almost absent ventilation. In this study, were observed a light sedation after 1 hour at $100 \mu\text{L L}^{-1}$ that remained until 8 hours of experiment.

Similar results were found by Khumpirapang et al. (2018) in koi carp at the same concentration, where the essential oil of *Alpinia galanga*, also of the family Zingiberaceae, using rhizomes, with the time of exposition of 5 minutes, was capable of inducing anesthesia stage 1, but was not able to induce stage 2 and 3 during the experimental period. Besides, another study developed by the same research group (Khumpirapang et al., 2018) using the essential oils of *Ocimum basilicum*, *O. canum*, and *O. sanctum* in common carp (*Cyprinus carpio*), atested that the essential oils can be used in fish as anesthetic at concentrations of 100, 200 and 300 mg/L, for a maximum exposition time of 20 minutes. In addition, in vitro tests of cytotoxicity with common carp peripheral blood cells at concentrations of 100, 200, 300, 400, and 500 mg/L, showed that at higher concentrations there was an increase in cytotoxicity in these cells.

Blood can show evidence of various metabolic changes, can provide insight into an animal's health condition, and can provide evidence of stress (Golombieski et al. 2016). The content of plasma proteins did not change by the treatments. Protein and amino acids metabolism can be affected by stress, since they can be used as an alternative source when carbohydrates and lipid reserves are exhausted (Hoseini et al, 2016), as the levels of plasma glucose, suggesting that EOZO did not affect blood parameters, maintaining homeostasis during the tests. Similar results were found in Nile tilapia (Brum et al., 2018).

Other parameter of stress, specifically oxidative stress, is related to antioxidants, that play a crucial role in maintaining homeostasis and, when these defenses are impaired, oxidative stress products, specifically reactive oxygen species (ROS), can cause DNA damage, and peroxidation of cell constituents and enzymatic inactivation. In response to exposure to oxidative stressors, to prevent damage caused by ROS, fish would be predicted to have greater levels of antioxidant enzymes. (Gopalakrishnan et al, 2011)

The SOD is one of the main enzymes in eliminating reactive oxygen species, formed during bioactivation of xenobiotics in tissues (Sk and Bhattacharya. 2006) catalyze the binding of ROS with water to generate H_2O_2 , and it is the first enzymatic defense against the superoxide anion. In the present study, SOD increased since the first hour of the experiment in the liver, and the highest levels were at $50 \mu L L^{-1}$. This result suggests induction of SOD antioxidant activity. A similar result was found in other investigations (Yadav et al, 2015; Souza et al, 2017).

Another enzyme important on the protection of oxidative stress is GPx that preventing lipid peroxidation in biomembranes (Van der Oost et al., 2003). In this study, there was an increase of GPx activity at both concentrations, 8 hours in the kidney and liver, and 4 hours after exposure in the liver, as SOD. This induction of antioxidant capacity in the tissues could be due to the antioxidant property exerted by the EOZO.

The lower levels of TBARS and protein carbonylation, with increased of SOD and GPx activity demonstrates that the essential oil improved the response to oxidative stress, mostly at concentration of $50 \mu L L^{-1}$, and could potentially be useful for preventing the damage, according to Saccol et al (2017) in matrinxã (*Brycon amazonicus*), Baldissera et al. (2017) in silver catfish (*Rhamdia quelen*).

The cholinergic nervous system is related to learning, memory and movement functions, acting through a close relationship capable of regulating acetylcholine (ACh) concentration, through the hydrolysis of this neurotransmitter by the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (Tonin, 2014). Measurement of AChE is widely used as a biomarker of exposure to several classes of neurotoxic compounds (Matozzo et al., 2005) Changes in AChE activity might be related to various contaminants (Payne et al., 1996; Miron et al., 2005; Ferrari et al., 2007). The levels of AChE did not show

significant differences in comparison to the control group, remaining regular after 8 hours of exposure to the essential oil of ginger, inferring that EOZO did not alter the enzyme activity, while remaining harmful, maintaining the homeostasis of the organism on this parameter.

Still related with homeostasis, the ionoregulation is important to ensure proper cell function (Hawang et al, 2011). The fish gain ions through their diet, and most fish are also able to accumulate ions by active uptake mechanisms associated with the ionocytes of gills. In fresh water, these cells can give off ammonium or hydrogen ions in exchange for an equal number of sodium ions and can give off bicarbonate ions in exchange for an equivalent number of chloride ions (Kroupova et al, 2005). Moreover, stress due to usual aquaculture procedures is known to affect fish ionoregulation (Ashley et al. 2007).

The ionoregulation in simulated transport with duration of 8 hours can undergo changes in the ionic flow, caused by stress in fish, with disturbance of ionic homeostasis, besides stimulating glycogenesis, gluconeogenesis, protein catabolism and ammonia production (Randall Ip & Chew 2010). This change causes efflux of ions according this study, as demonstrated by Garcia et. al (2010) and Souza et.al (2015) in silver catfish, also with essential oils. Besides, according to Baldisserotto et al (2007), this stress may causes an increase in the respiratory surface area, to improve oxygen uptake would also increase ion loss by the gills, and could increase ion branchial efflux (McDonald et al., 1991). That was observed in this study, in Na^+ and Cl^- , where the EOZO weren't capable to reduced ion loss at highest concentration in this ions.

Changing the strong ion difference in the extracellular compartment through the differential loss of ions across the gills must constrain a change in the acidbase status of that compartment. For example, an efflux of anions than cations from the extracellular compartment to the water will increase the extracellular strong ion difference (given equivalent rates of influx), thereby constraining an increase in extracellular pH and HCO_3^- (Goss et. al, 1992).

But, at the $50 \mu\text{L L}^{-1}$, had an influx of Cl^- . Moreover, had an influx of K^+ too, at highest concentration. The K^+ concentration gradient between freshwater and interstitial fluid may not favor the passive influx of K^+ , but a negative transepithelial

potential (water side as 0 mV) may be able to counter the concentration gradient and cause K⁺ influx through tight junctions (Horng et.al, 2017).

Conclusion

The EOZO induces the enzyme antioxidant and prooxidant activity, demonstrated by the levels of SOD, GPx, TBARs and protein carbonyl, providing protection for carp from ROS overgrowth on the concentration of 50 $\mu\text{L L}^{-1}$. The concentrations used did not cause any mortality. Besides that the EOZO has a light effect of sedation in carp at 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ after 1 hour until 8 hours of exposition. Also, did not have significant differences in AChE and plasma parameters, at both concentrations, indicating the maintaining of physiology homeostasis. Besides, the EOZO reverting the ion loss of Cl⁻ at the minor concentration, and K⁺ at the highest concentration.

Acknowledgment

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process 302076/2017-4 for financial support. Mauro Alves da Cunha and Marisa Teresinha de Bastos Brasil received support of CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), Milena Fortuna and Carine de Freitas Souza received a support of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

Ashley PJ (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *App Anim Behav Sci* 104:199-235.

Azambuja CR, Mattiazzi J, Riffel APK, Finamor IA, Garcia LO, Heldwein CG, Heinzmann BM, Baldisserotto B, Pavanato MA, Llesuy SF (2011). Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319:156-161.

Baldissera MD, Souza CF, Júnior GB, de Vargas AC, Boligon AA, de Campos MMA, Stefani LM, Baldisserotto B (2017). *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. *Fish Shellfish Immunol.* 61:1–8.

Baldisserotto B, Chippari-Gomes AR, Lopes NP, Bicudo JEPW, Paula-Silva MN, Almeida-Val VMF, Val AL (2007). Ion fluxes and hematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon, exposed to hypoxia. *Braz. J. Biol* 68:571-575.

Balon EK (1995). Origin and domestication of the wild carp (*Cyprinus carpio*) from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129:3-48.

Benovit SC, Gressler LT, Silva LL (2012). Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*., *Journal of the world aquaculture society* 43:896-900.

Boyd CE, Tucker CS (1992). Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Auburn University, 183.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Brander KM (2007) Global fish production and climate change. *Proceedings of the National Academic Sciences* 104:19709–19714.

Brum A, Pereira SA, Cardoso L, Chagas EC, Chaves FCM, Mouriño JLP, Martins ML (2018). Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. *Fish & Shellfish Immunology* 74:444-449 .

Buege, J.A., Aust, S.D., (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302–309.

Burt S (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food. Microbiol* 4:223–253.

Carlberg I, Mannervik B (1985). Glutathione reductase assay. *Methods in Enzymol.* Academic Press, Orlando FL.113:484–495.

Carmany DO, Mach PM, Rizzo GM, Dhummakupt ES, McBride EM, Sekowski JW, Benton B, Demond PS, Busch MW, Glaros T (2018) On-substrate Enzymatic Reaction

to Determine Acetylcholinesterase Activity in Whole Blood by Paper Spray Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 1-7.

Castro VSP, Da Silva AS, Thomé GR, Wolkmer P, Castro JLC, Costa MM, Graça DL, Oliveira DC, Alves SH, Schetinger MRC, Lopes STA, Stefani LM, Azevedo MI, Baldissera MD, Andrade CM (2017). Oxidative stress in rats experimentally infected by *Sporothrix schenckii*. *Microb. Pathog.* 107:1–5.

Chen J, Li C, Huang R, Du F, Liao L, Zhu Z, Wang Y (2012). Transcriptome analysis of head kidney in grass carp and discovery of immune-related genes. *BMC Veterinary Research*, 8.

Cunha MA, Barros CMF, Garcia LO, Veeck APL, Heinzmann BM, Loro VL, Emanuelli T, Baldisserotto B (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 306:403-406.

Dubois MKA, Gilles JK, Hamilton PA, Rebers FS (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Analytical Chemistry* 28 (3):350-356.

Evans DH, Clairborne JB, Farmer L, Mallery C, Krasny JREJ (1982) Fish gill ionic transport: methods and models. *Biol. Bull.* 163:108-130.

Façanha M F, Gomes LC (2005). Efficacy of menthol as an anesthetic for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica* 35: 17-75.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88–95.

Freidovich I (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,893:1-13.

Garcia LO, Barcellos LJG, Baldisserotto B. (2015) Net ion fluxes and ammonia excretion during transport of *Rhamdia quelen* juveniles. *Ciência Rural*, 45.

Golombieski JI, Sutili FJ, Salbego J, Seben D, Gressler LT, Cunha JALT, Zanella, RRA, Vaucher RA, Marchesan E (2016). Imazapyr β imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 128:91–99.

Gonzalez RJ, Wood CM, Wilson RW, Patrick MJ, Bergman HL, Narahara A, Val AL (1998). Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. *Physiological Zoology* 7(1):15-22.

Gressler LT, Sutili FJ, Loebens L, Saccol EMH, Pes TS, Parodi TV, da Costa ST, Baldisserotto B (2015). Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. *Aquacult Res* 47:2297-2306.

Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG (2005). Ginger – an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J. Med. Food* 8:125–132.

He LB, Zhang AD, Chu PF, Li YM, Huang R, Liao LJ (2017) Deep Illumina sequencing reveals conserved and novel microRNAs in grass carp in response to grass carp reovirus infection, *BMC Genom.* 18:195.

Heuton M, Ayala L, Morante A, Dayton K, Jones AC, Hunt JR, McKenna A (2018) Oxygen consumption of desert pupfish at ecologically relevant temperatures suggests a significant role for anaerobic metabolism. *Journal of Comparative Physiology B*, 188:821–830.

Horng, J. L., Yu, L. L., Liu, S. T., Chen, P. Y., & Lin, L. Y. (2017). Potassium Regulation in Medaka (*Oryzias latipes*) Larvae Acclimated to Fresh Water: Passive Uptake and Active Secretion by the Skin Cells. *Scientific reports*, 7(1), 16215.

Hoseini, S.M. Mirghaed, A.T. Yousefi, M. (2018) Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 0-15.

Hoseini SM, Tort L, Abolhasani MH, Rajabiesterabadi H (2016). Physiological, ionoregulatory, metabolic and immune responses of *Persian sturgeon, Acipenser persicus* (Borodin, 1897) to stress. *Aquacult Res* 47:3729-3739.

Hwang PP, Lee TH, Lin LY (2011). Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol-Reg I*, 301:28-47.

Jafarinejad R, Gharaei A, Harijani M.J (2018). Dietary ginger improve growth performance, blood parameters, antioxidant capacity and gene expression in *Cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 1-17.

Jensen FB (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135, 9-24.

Khumpirapang N, Pikulkaew S, Anuchapreeda S, Okonogi S (2018). *Alpinia galanga* oil—A new natural source of fish anaesthetic. *Aquaculture Research*, 1-11.

Kikusaki H, Nakatani N (1993). Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal of Food Science* 58:1407.

Kim JK, Kim Y, Na KM, Surh YJ, Kim TY (2007) [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Res.* 41: 603–614.

Kroupova H, Machova J, Svobodova Z (2005). Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina* 50: 461–471.

Khumpirapang N, Pikulkaew S, Anuchapreeda S. (2018). *Alpinia galanga* oil—A new natural source of fish anaesthetic. *Aquaculture Research*, 1–11.

Lin RJ, Chen CY, Lu CM, Ma YH, Chung LY, Wang JJ, Lee JD, Yen CM (2014). Anthelmintic constituents from ginger (*Zingiber officinale*) against *Hymenolepis nana*. *Acta Tropica* 140:50-60.

Matozzo V, Tomei A, Marin MG. (2005) Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull.* 50 (12):1686-93.

McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108,652.

McDonald DG, Cavdek V, Ellis R. Gill design in freshwater fishes. (1991) Interrelationships among gas exchange, ion regulation, and acid-base regulation. *Physiol Zool.* 1991; 64(1):103-23.

Miron D, Crestani M, Schetinger RM, Morsch MV, Baldisserotto B, Tierno AM, Moraes G, Vieira PLV (2005). Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61:398–403.

Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175

Neiffer DL, Stamper AM (2009). Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR Journal* 50:343–360.

Palic D, Herolt DM, Andreasen CB, Menzel BW, Roth JA (2006). Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol

concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* 254:675-685.

Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32:225–231.

Ross GL & B Ross (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Oxford, Blackwell Science 3rd ed., 222.

Roubach R, Gomes LC, Fonseca FAL, Val AL (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res* 36:1-6.

Saccol EMH, Londero EP, Bressan CA, Salbego J, Gressler LT, Silva LVF, Mourao RHV, Pavanato MA (2017). Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 44 (3):555-566.

Singh G, Kapoor IPS, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CAN (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food. Chem. Toxicol.* 46:3295–3302.

Silva LL, Parodi T V (2012). Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 350- 353.

Sk HU, Bhattacharya S (2006). Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of organoselenocyanates. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 298-308.

Souza CF, Baldissera MD, Bianchini AE, da Silva EG, Mourão RHV, da Silva LVF, Schmidt D, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2018). 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 Physiol Biochem* 44(1):21-34.

Souza CF, Salbego J, Gressler LT, Golombieski JI, Frest JG, Cunha MA, Heinzmann BM, Caron BA, Glanzner WG, Gonçalves PBD, Baldisserotto B. (2015) *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. *Neotrop. ichthyol.* 13. n.4

Storelli M M (2008). Potential human health risk from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). *Food and Chemical Toxicology* 46(8):2782–2788.

Sternisa M, Mraz J, Mozina SS (2016). Microbiological aspects of common carp (*Cyprinus carpio*) and its processing—relevance for final product quality: a review. *Aquacult* 24:1569-1590.

Sutton DL, Vandiver VV (1986). "Grass Carp: A Fish for Biological Management of Hydrilla and Other Aquatic Weeds in Florida," University of Florida, Agricultural Experiment Station, Gainesville, FL.

Tonin, A. A. (2014) Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. UFSM.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57–149.

Vandeputte M (2003) Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquat. Living Resour.* 16:399–407.

Velisek J, Własow T, Gomulka P, Svobodová Z, Novotný L, Ziomek E (2006). Effects of clove oil anaesthesia on european catfish (*Silurus glanis L.*) *Acta Vet Brno*, 75:99–106.

Verdouw H, Vanechteld CJA, Deckkers EMJ (1978). Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12:399-402 .

Vilizzi L (2012). The common carp, *Cyprinus carpio*, in the Mediterranean Region: origin, distribution, economic benefits, impacts and management. *Fisheries Management and Ecology* 19(2):93–110.

Weber III ES (2011). Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exot Anim Pract.* 14:21-32.

Woynarovich A, Moth-Poulsen T, Pe'teri A (2010) Carp polyculture in Central and Eastern Europe, the Caucasus and Central Asia. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical* 554. FAO, Rome.

Wu YS, Huang SL, Chung HC, Nan FH (2017) Bioaccumulation of lead and non-specific immune responses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to Pb exposure. *Fish Shellfish Immun.* 62:116–123.

Xavier S Percis P, Gnassia-Barelli M, Romeo M, Lafaurie M (1998) Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut* 99:339–345.

Yemitan OK, Izegbu MC (2006) Protective effects of *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against carbon tetrachloride and acetaminopheninduced hepatotoxicity in rats. *Phytother.* 20:997-1002.

Yadav SS, Kumar R, Khare P, Tripathi M (2015) Oxidative Stress Biomarkers in the Freshwater Fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) Exposed to Sodium Fluoride: Antioxidant Defense and Role of Ascorbic Acid. *Toxicology International* 22, 71-6.

Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low density lipoproteins. *Anal Biochem*, 228:349-351.

Zall DM, Fisher MD, Garder Q M (1956) Photometric determination of chlorides in water. *Analytical Chemistry* 28:1665-1678.

Figure Captions

Figure 1. TBARS levels in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 2. Protein carbonyl levels in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 3. SOD activity in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 4. GPx activity in the liver (A) and kidney (B) of carp after 1, 4 and 8 hours of treatment. Asterisks indicate significant difference from the basal group at $p \leq 0.05$. Capital letters indicate significant differences between time points, within the same treatment. Lowercase letters indicate significant differences between treatments at the same time point.

Figure 5. Net ion Na^+ , Cl^- , K^+ fluxes in carp at different concentration, through 8 h of exposure to ginger essential oil. Positive values indicate net influxes and negative values net effluxes.

Table 1. High-resolution gas chromatography with the components (%) of ginger essential oil. Peaks less than 0.1% were excluded.

Table 2. Effects of ginger essential oil on plasma parameters, glucose (A) and total protein (B) expressed by mg/dL. Data represent the mean \pm SEM.

Figures

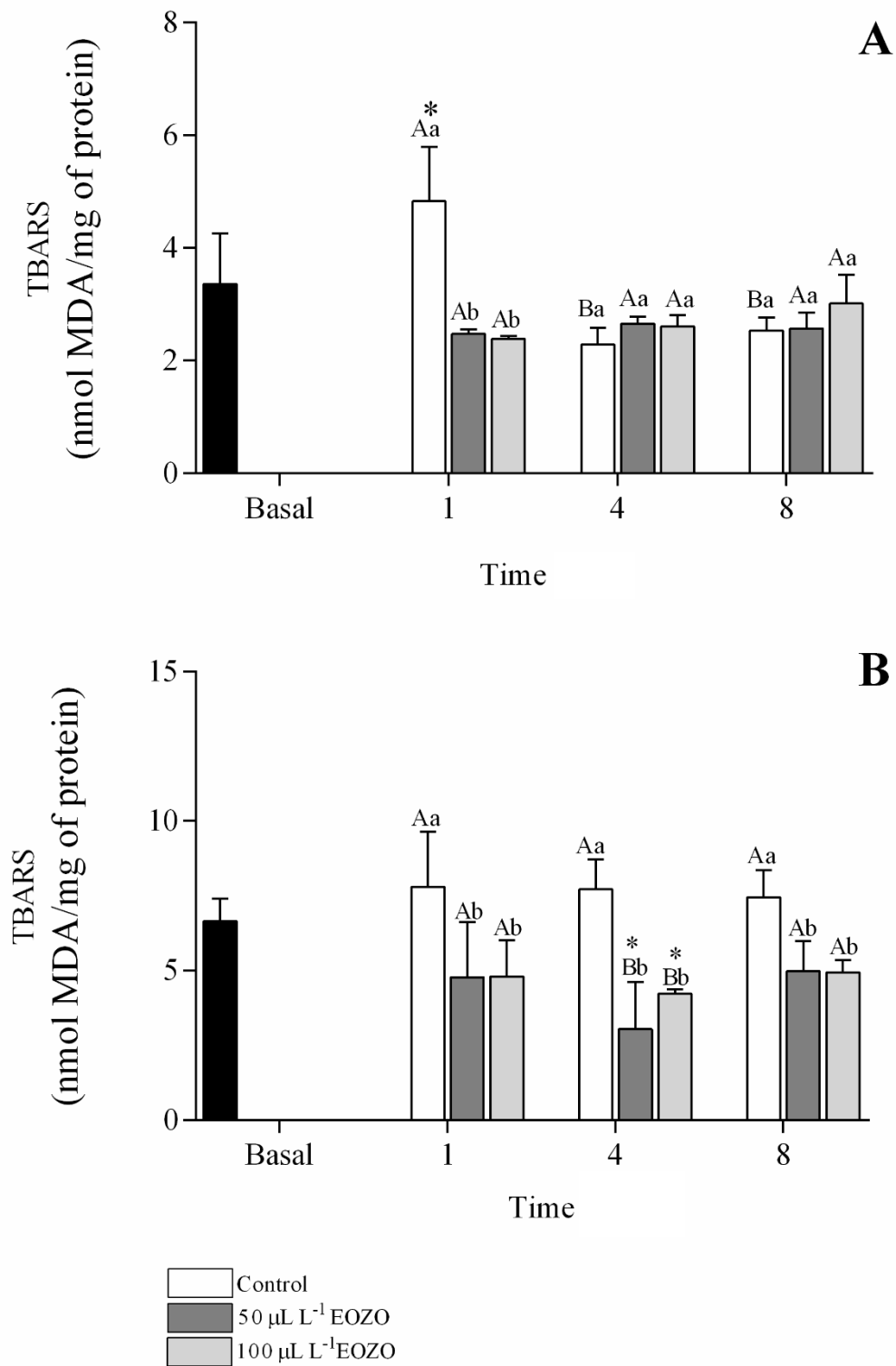


FIGURE 1

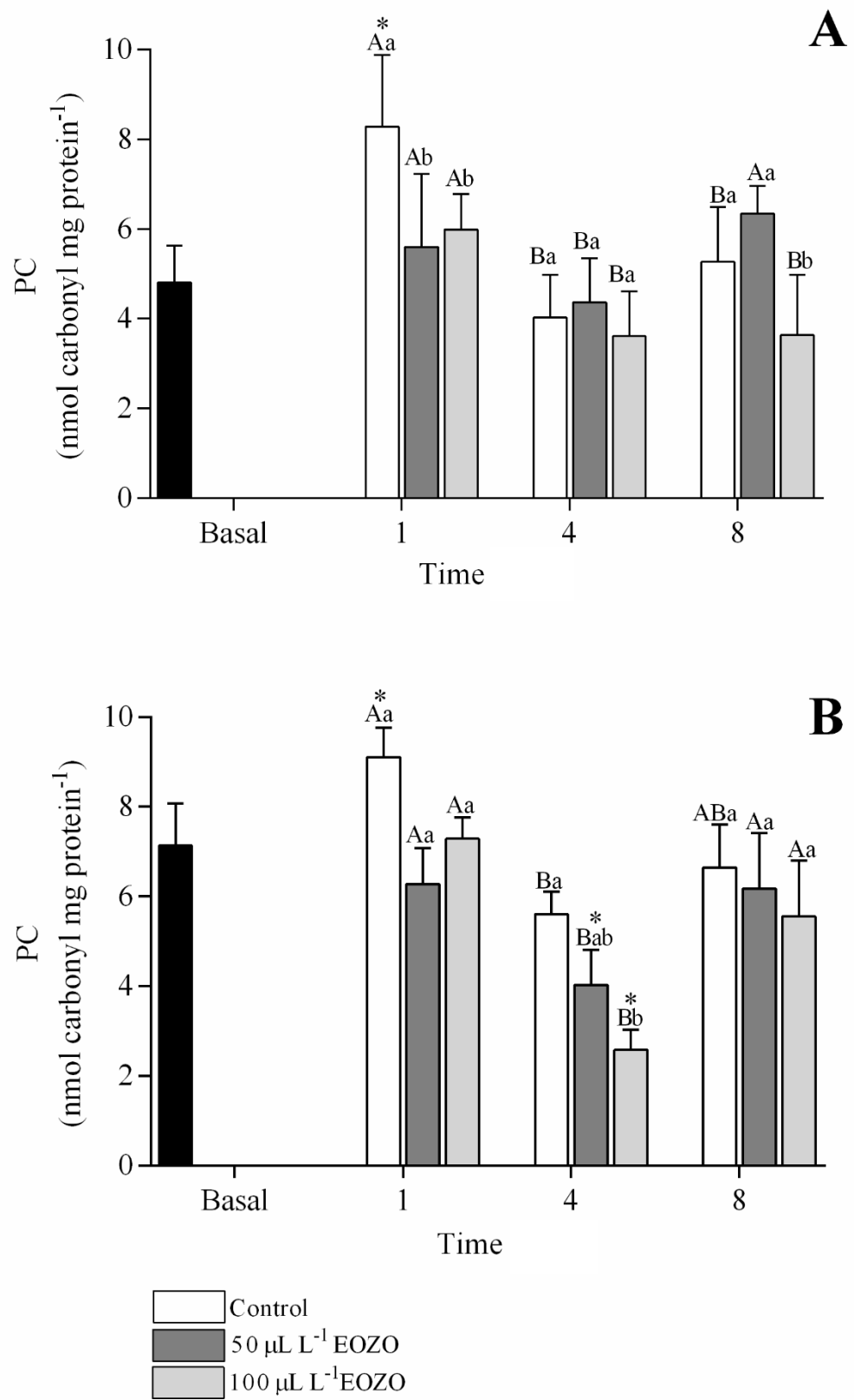


FIGURE 2

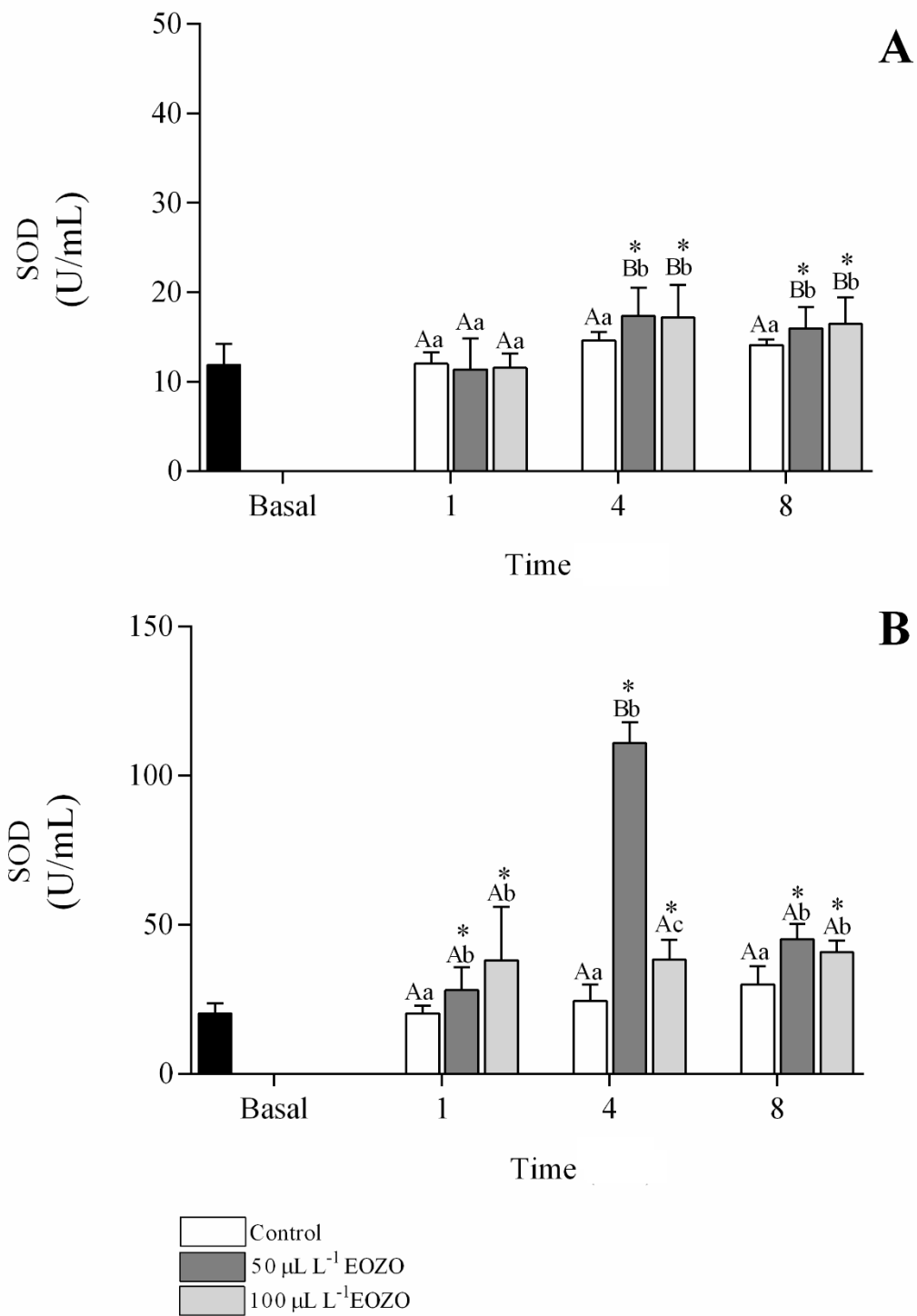


FIGURE 3

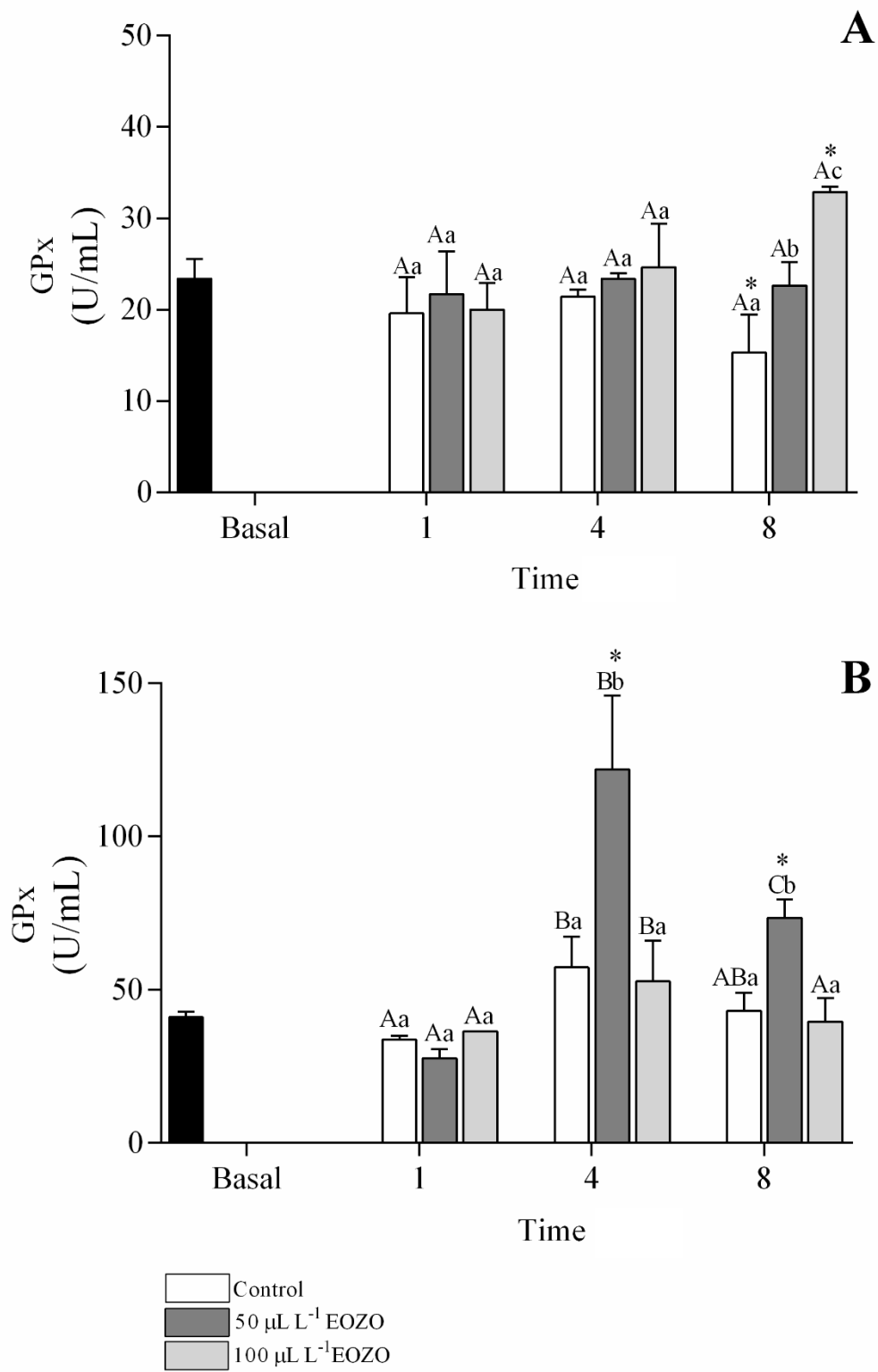
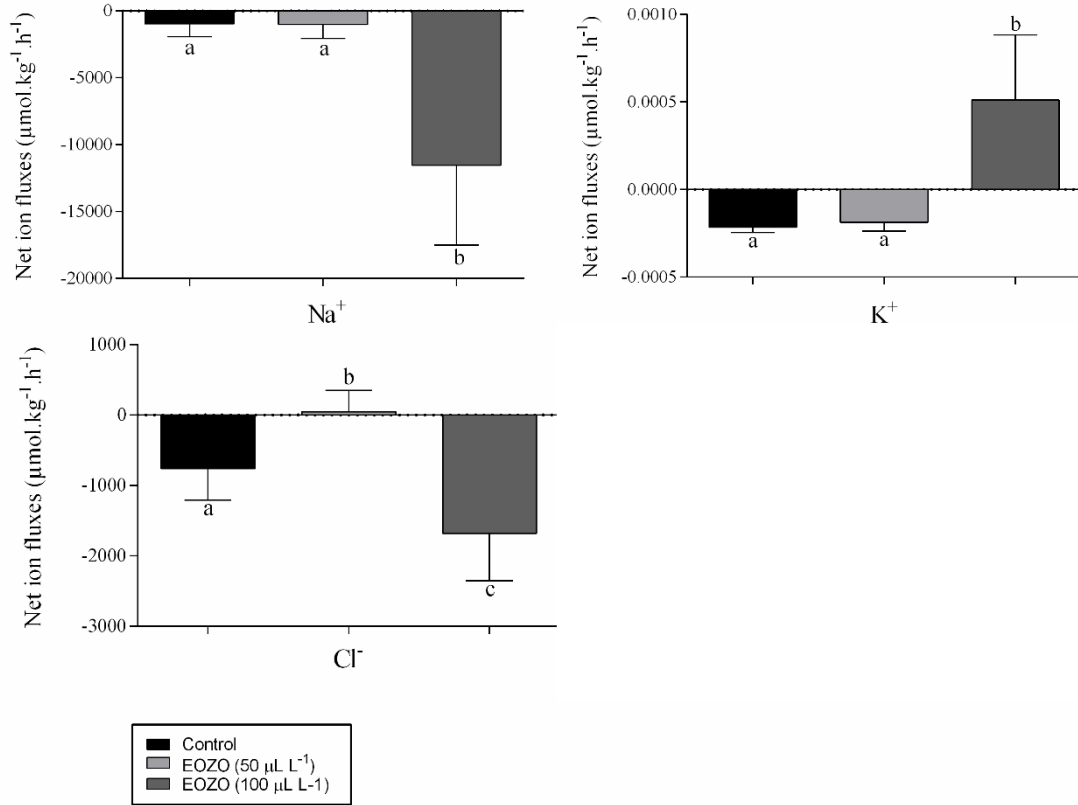


FIGURE 4

**FIGURE 5**

Peak	Constituent ID	%
1	α -thujene	0,2
2	α -pinene	2,5
3	camphene	8,3
4	sabinene	0,4
5	octenal	0,4
6	mircene	1,3
7	carene	0,4
8	α -terpinene	0,3
9	p-cimene	0,1
10	limonene	7,6
11	1,8-cineol	1,5
22	geranyl acetate	0,9
23	β -cariofilene	0,5
28	germacrene d	1,8
29	ar-curcumene	12,4
30	α -muurolene	1,4
31	zingiberene	31,8
32	α -farnesene	7,7
33	β -bisabolene	3,7
34	β -sesquifelandrene	13,0

TABLE 1

A

Concentration ($\mu\text{L/L}^{-1}$)	Time (Hours)		
	1	4	8
0	36.50190	31.49556	31.22624
50	30.83016	21.64132	36.12167
100	25.06337	35.07605	49.809.89

B

Concentration ($\mu\text{L/L}^{-1}$)	Time (Hours)		
	1	4	8
0	0.688112	0.977156	0.910023
50	0.796270	1.137529	0.958508
100	0.758974	0.716084	1.161772

TABLE 2

4 CONCLUSÕES FINAIS

- O óleo essencial de gengibre apresenta potencial para uma alternativa como antioxidante natural.
- O óleo essencial promoveu sedação leve em carpas capim na concentração mais elevada utilizada, a longo prazo.
- O óleo essencial reverteu a perda de íons Cl^- na menor concentração, e houve um influxo de K^+ na maior concentração, porém, nas demais, não foi capaz de reverter a perda de íons relativa ao fluxo iônico nesta espécie, sendo necessário acompanhamento para evitar possíveis danos.
- O óleo essencial não altera a atividade da enzima Acetilcolinesterase tanto no cérebro como no músculo em carpas.
- O óleo essencial não altera parâmetros como glicose plasmática e proteínas totais, mantendo a homeostase com referência a esses parâmetros.