

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
FARMACOLOGIA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL

Alessandro Casale dos Santos

**APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALOYSIA CITRIODORA*
PALÁU E DO CITRAL ADICIONADOS À ÁGUA E À DIETA PARA
JUNDIÁ E CARPA-CAPIM**

Santa Maria, RS
2021

Alessandro Casale dos Santos

**APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALOYSIA CITRIODORA* PALÁU E DO
CITRAL ADICIONADOS À ÁGUA E À DIETA PARA JUNDIÁ E CARPA-CAPIM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na área de Farmacologia Aplicada à Produção Animal, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS
2021

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

Santos, Alessandro Casale dos
Aplicações do óleo essencial de aloysia citriodora
Paláu e do citral adicionados à água e à dieta para jundiá
e carpa-capim / Alessandro Casale dos Santos.- 2021.
117 p.; 30 cm

Orientador: Bernardo Baldisserotto
Coorientador: Mauro Alves da Cunha
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Farmacologia veterinária 2. Aquicultura 3.
Psicultura 4. Anestesiologia 5. Antimicrobianos I.
Baldisserotto, Bernardo II. Cunha, Mauro Alves da III.
Título.

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

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

Alessandro Casale dos Santos

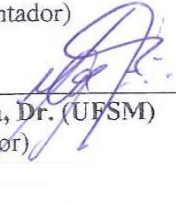
**APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALOYSIA CITRIODORA* PALÁU E DO
CITRAL ADICIONADOS À ÁGUA E À DIETA PARA JUNDIÁ E CARPA-CAPIM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na área de Farmacologia Aplicada à Produção Animal, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

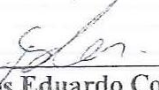
Aprovado em 20 de março de 2020:



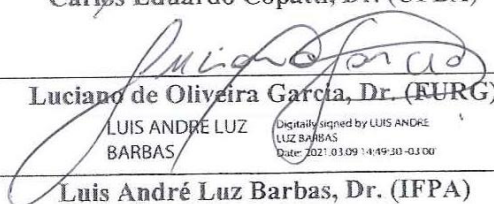
Bernardo Baldisserotto, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Mauro Alves da Cunha, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)



Carlos Eduardo Copatti, Dr. (UFBA)



Luciano de Oliveira Garcia, Dr. (FURG)

LUIS ANDRÉ LUZ
BARBAS

Digitally signed by LUIS ANDRÉ
LUZ BARBAS
Date: 2021.03.09 14:49:30 -03'00'

Luis André Luz Barbas, Dr. (IFPA)



Maria José Tavares Ranzani de Paiva, Dr. (IP)

Adobe Sign Test Document

not for commercial use

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Mauro Alves da Cunha pela oportunidade de poder fazer a minha vida melhor. Agradeço à parceria, orientação e os bons momentos vividos.

Agradeço ao Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto pelos bons exemplos.

Agradeço à Prof. Dra. Berta Maria Heinzmann pela atenção e simpatia.

Me sinto honrado por ter tido a possibilidade de contribuir com tão dignas pessoas.

Agradeço à toda família, mãe (*in memoriam*), que sempre me incentivou a estudar. Agradeço ao meu pai e meu irmão, sem os quais não teria tido a possibilidade de concluir esse trabalho.

Agradeço aos outros amigos do PPG e de toda a UFSM, sem os quais, muita beleza teria sido perdida.

Quem somos?

De onde viemos?

Para onde vamos?

...

Anônimo

RESUMO

APLICAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALOYSIA CITRIODORA* PALÁU E DO CITRAL ADICIONADOS À ÁGUA E À DIETA PARA JUNDIÁ E CARPA-CAPIM

AUTOR: Alessandro Casale dos Santos
ORIENTADOR: Bernardo Baldisserotto
CO-ORIENTADOR: Mauro Alves da Cunha

O presente estudo trata da eficácia do citral adicionado à água como sedativo e anestésico em jundiá (*Rhamdia quelen*) e carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Trata da segurança anestésica do óleo essencial (OE) de *Aloysia citriodora* Paláu e do citral em jundiá. Além disso, trata do efeito protetor do OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá contra a inoculação experimental de *Aeromonas hydrophila*. Embora o OE de *A. citriodora* já tenha sua eficácia sedativa e anestésica comprovada em peixes, este é o primeiro relato do citral como sedativo e anestésico em jundiá e carpa-capim. A eficácia sedativa e anestésica do citral foi comprovada pela verificação dos tempos transcorridos para indução de sedação e anestesia e, recuperação de anestesia, a partir de diferentes concentrações da substância. Além disso, foi verificada a concentração ideal para indução de anestesia rápida em ambas espécies, a partir da determinação da concentração mínima efetiva capaz de alcançar o efeito máximo observado. A segurança de procedimentos anestésicos induzidos pelo OE de *A. citriodora* e pelo citral foi verificada para a manutenção de anestesia durante 10 min em jundiá. A indução de anestesia foi feita a partir da concentração capaz de alcançar o nível de efeito imediatamente anterior ao efeito máximo verificado e, a manutenção foi realizada a partir da concentração mínima capaz de induzir anestesia, dentro do período máximo proposto de 30 min. Para isto, foram verificados dados sobre mortalidade, além de determinações hematológicas e bioquímicas, após os procedimentos. A eficácia de diferentes doses do OE de *A. citriodora* na proteção de jundiá contra a inoculação experimental por *A. hydrophila* foi verificada a partir de dados sobre mortalidade, além de determinações hematológicas e bioquímicas. O citral foi eficaz em induzir sedação em jundiá e carpa-capim em concentrações variando de 15 a 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ e, anestesia sem mortalidade em concentrações variando de 50 a 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ em jundiá e 75 a 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ em carpa-capim. Mortalidade foi verificada nas concentrações de 675 e 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ em jundiá e carpa-capim, respectivamente. A concentração ideal para a indução de anestesia rápida foi 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ em ambas as espécies. O OE de *A. citriodora* e o citral foram seguros na indução e manutenção de anestesia em jundiá a partir de concentrações de 225 $\mu\text{L L}^{-1}$ para indução e, 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ para manutenção. Não houve mortalidade na manutenção de anestesia e, o único parâmetro determinado que apresentou variação foi a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), que variou em função dos diferentes grupos formados e momentos de coleta. O OE de *A. citriodora* possivelmente protegeu jundiás contra a inoculação experimental por *A. hydrophila* na dose de 2 ml Kg^{-1} . Portanto, o OE de *A. citriodora* e o citral são substâncias com potencial uso em piscicultura como sedativos e anestésicos e, o OE de *A. citriodora* na proteção contra a infecção por *A. hydrophila*.

Palavras chave: *Aeromonas hydrophila*. *Aloysia triphylla*. Anestesia. *Ctenopharyngodon idella*. *Rhamdia quelen*. Sedação.

ABSTRACT

APPLICATIONS OF THE ESSENTIAL OIL OF *ALOYSIA CITRIODORA* PALÁU AND THE CITRAL ADDED TO WATER AND TO DIET FOR SILVER CATFISH AND GRASS CARP

AUTHOR: Alessandro casale dos Santos

ADVISOR: Bernardo Baldisserotto

CO-ADVISOR: Mauro Alves da Cunha

The present study deals with the effectiveness of citral added to water as a sedative and anesthetic in silver catfish (*Rhamdia quelen*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). It deals with the anesthetic safety of the essential oil (EO) of *Aloysia citriodora* Paláu and citral in jundiá. In addition, it deals with the protective effect of OE of *A. citriodora* added to the jundiá diet against the experimental inoculation of *Aeromonas hydrophila*. Although *A. citriodora* EO has already proven its sedative and anesthetic efficacy in fish, this is the first report of the citral as sedative and anesthetic in silver catfish and grass carp. The sedative and anesthetic efficacy of citral was confirmed by checking the time elapsed for inducing sedation and anesthesia and, recovering from anesthesia, using different concentrations of the substance. In addition, based on the determination of the minimum effective concentration capable of achieving the maximum effect observed, the ideal concentration for inducing rapid anesthesia in both species was verified. The safety of anesthetic procedures induced by the EO of *A. citriodora* and citral was verified to maintenance of anesthesia for 10 min in silver catfish. Anesthesia was induced from the concentration capable of reaching the level of effect immediately prior to the maximum effect observed, and maintenance was performed from the minimum concentration capable of inducing anesthesia, within the maximum proposed period of 30 min. For this, data on mortality were verified, in addition to hematological and biochemical determinations, after the procedures. The efficacy of different doses of EO of *A. citriodora* in protecting silver catfish against experimental inoculation by *A. hydrophila* was verified from data on mortality, in addition to hematological and biochemical determinations. Citral was effective in inducing sedation in silver catfish and grass carp in concentrations ranging from 15 to 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ and, anesthesia without mortality in concentrations ranging from 50 to 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ in silver catfish and 75 to 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ in grass carp. Mortality was verified in the concentrations of 675 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ in jundiá and grass carp, respectively. The ideal concentration for the induction of rapid anesthesia was 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ in both species. The EO of *A. citriodora* and citral were safe in inducing and maintaining anesthesia in silver catfish from concentrations of 225 $\mu\text{L L}^{-1}$ for induction and 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ for maintenance. There was no mortality in maintaining anesthesia, and the only determined parameter that showed variation was the mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), which varied according to the different groups formed and the moments of collection. The OE of *A. citriodora* possibly protected silver catfish against experimental inoculation by *A. hydrophila* at a dose of 2 ml Kg^{-1} . Therefore, the EO of *A. citriodora* and citral are substances with potential use in fish farming as sedatives and anesthetics, and the OE of *A. citriodora* to protect against infection by *A. hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*. *Aloysia triphylla*. Anesthesia. *Ctenopharyngodon idella*. *Rhamdia quelen*. Sedation.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

Figura 1 – A planta <i>Aloysia citriodora</i> Paláu. Visão em distância	25
Figura 2 – A planta <i>Aloysia citriodora</i> Paláu. Detalhe das folhas e flores	26
Figura 3 – A planta <i>Aloysia citriodora</i> Paláu. Detalhe da brotação.....	26
Figura 4 – A planta <i>Aloysia citriodora</i> Paláu.....	27
Figura 5 – A estrutura química do citral. À esquerda o α -citral (citral a, geranial) e à direita o β -citral (citral b, neral).....	29
Figura 6 – Peixe anestesiado. Detalhe da aeração constante do aquário durante o procedimento	34
Figura 7 – Necrose de nadadeira e úlcera cutânea em jundiá infectado com <i>A. hydrophyla</i>	44
Figura 8 – O Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>). Peixes juvenis	47
Figura 9 – O Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>). Peixe adulto	47
Figura 10 – A carpa-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>). Peixe juvenil.....	48
Figura 11 – A carpa-capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>). Peixe adulto	48
Figura 12 – Composição química do diluente desenvolvido por Natt e Herrick (1952) para a determinação do número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas de galinha no hemocitômetro	51

MANUSCRITO 1

Fig. 1. Survival of silver catfish fed a diet containing different concentrations of <i>Aloysia triphylla</i> essential oil (EO) for 21 days following infection with <i>A. hydrophyla</i> (time of infection evaluated: 10 days). (*) indicates a significant difference relative to the control as determined by Kaplan-Meier survival analysis with Logrank test ($P \leq 0.05$).....	56
--	----

MANUSCRITO 2

Figure 1. Time required for sedation induction by citral in silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i> , RQ) and grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i> , CI) ($n = 8$ per treatment) according to Small (2003). Data are means \pm standard error. Different letters in the columns indicate a significant difference between the concentrations of the same species. *Significant difference between the different species at the same concentrations ($p < 0.05$).....	83
Figure 2. Time required for induction and recovery from anesthesia by citral in A - silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i> , RQ) and B - grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i> , CI) ($n = 8$ per treatment) according to Small (2003). Data are means \pm standard error. Different letters in the columns indicate a significant difference between the concentrations of the same species ($p < 0.05$).....	84
Figure 3. Time required for induction and recovery from anesthesia by citral ($n = 8$ per treatment) in silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i> , RQ) and grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i> , CI) according to Small (2003). Data are means \pm standard error. *Significant difference between the different species at the same concentrations ($p < 0.05$).....	86

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 – Composição química do OE de <i>A. citriodora</i> utilizado por Zeppenfeld et al. (2016), onde α -citral e β -citral (citral) foram verificados como componentes mais abundante presentes	30
Tabela 2 – Estágios de anestesia em peixes	35

MANUSCRITO 1

Table 1. Hematological and biochemical responses of silver catfish fed diets containing different concentrations (mL OE/kg diet) of <i>Aloysia triphylla</i> essential oil	55
--	----

MANUSCRITO 2

Table 1. Chemical composition of <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO.	76
Table 2. Erythrogram and total plasma protein of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after exposure to <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO and citral.	77
Table 3. Leukogram of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after exposure to <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO and citral.	78
Table 4. Biochemical parameters (enzymes and lipids) of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) exposed to anesthesia with <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO and citral on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after exposure.	79
Table 5. Biochemical parameters (metabolites and glucose) of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) exposed to anesthesia with <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO and citral on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after exposure.	80
Table 6. Biochemical parameters (proteins and ions) of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) exposed to anesthesia with <i>Aloysia citriodora</i> Paláu EO and citral on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after exposure.	81

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	19
1.1	INTRODUÇÃO	19
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
1.2.1	A aquicultura, a piscicultura e, a produção e comércio de carne de peixe e derivados	20
1.2.2	As drogas veterinárias autorizadas para uso em peixes	21
1.2.3	A planta <i>Aloysia citriodora</i> Paláu	24
1.2.4	O óleo essencial da <i>Aloysia citriodora</i> Paláu e o citral.....	28
1.2.5	As substâncias com ação sedativa e anestésica para uso em peixes.....	31
1.2.6	O uso do óleo essencial da <i>Aloysia citriodora</i> Paláu e do citral como sedativos e anestésicos para peixes.....	35
1.2.7	As substâncias com ação antimicrobiana para uso em peixes	37
1.2.8	A ação antimicrobiana do OE de <i>A. citriodora</i> Paláu	40
1.2.9	As infecções por <i>Aeromonas</i> spp. em peixes.....	41
1.2.10	Os modelos experimentais	44
1.2.11	Determinações hematológicas e bioquímicas.....	48
1.3	OBJETIVOS.....	51
1.3.1	Objetivos gerais	51
1.3.2	Objetivos específicos	52
2	DESENVOLVIMENTO	53
2.1	MANUSCRITO 1 E MANUSCRITO 2.....	53
2.1.1	Manuscrito 1	53
2.1.2	Manuscrito 2	58
2.2	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS RESULTADOS OBTIDOS.....	87
2.2.1	A ligação do efeito sedativo e anestésico do OE de <i>A. citriodora</i> Paláu com o citral e a ausência de efeitos colaterais durante a indução e recuperação dos procedimentos em peixes	87
2.2.2	A mortalidade nos estudos sobre a eficácia anestésica do OE de <i>A. citriodora</i> Paláu e do citral em peixes	88
2.2.3	A duração dos procedimentos anestésicos em peixes.....	89
2.2.4	Anestesia rápida: indução e recuperação rápidas de anestesia pelo citral em jundiá e carpa-capim	90
2.2.5	A segurança do procedimento de indução e manutenção de anestesia em jundiá.....	92
2.2.6	O OE de <i>A. citriodora</i> Paláu adicionado à dieta de jundiá e a proteção contra a infecção experimental por <i>Aeromonas hydrophila</i>	94
3	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	99

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

O óleo essencial (OE) da planta *Aloysia citriodora* Paláu, quando adicionado à dieta dos peixes ou à água dos aquários, tem sido estudado por induzir diversos efeitos fisiológicos nestas espécies, como antioxidante, sedativo, anestésico e estimulante do crescimento corporal (ALI; EL-BELTAGI; NASR, 2011; GRESSLER, et al., 2014; PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017; ZEPPEFELD et al., 2014, 2016). Além disso, o OE de *A. citriodora* tem sido utilizado como conservante de alimentos, adicionado em pequenas quantidades à carne e produtos derivados da carne de peixes destinados para consumo (DANIEL et al., 2016). Dentre os fitoquímicos que constituem o OE de *A. citriodora*, o citral ocorre frequentemente como componente mais abundante, dependendo da origem da planta em questão. (ALI; EL-BELTAGI; NASR, 2011; BAHRAMSOLTANI et al., 2018; DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017; ZEPPEFELD et al., 2014, 2016).

Em função da escassez de drogas veterinárias autorizadas para usos específicos em peixes criados para consumo verificada na Europa (FISHMEDPLUS COALITION, 2017) e nos Estados Unidos (AMERICAN FISHERIES SOCIETY, 2019; CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2007, 2020), substâncias com atividades sedativa e anestésica, além de substâncias com ação contra infecções causadas por bactérias *Aeromonas* spp., entre outras indicações, são prioridades para o desenvolvimento e aprovação de novas drogas. No Brasil, as discussões sobre os problemas que afetam e impedem o crescimento da piscicultura nacional permanecem em um nível mais básico, contemplando problemas estruturais como falta de água em algumas localidades e a ineficiência das regulações específicas, que variam entre os Estados da Federação e não são eficientes na valorização do produto Brasileiro frente ao mercado internacional (PEIXE BR, 2020).

Apesar de estudos mais abrangentes, que envolvem a farmacocinética orgânica das substâncias medicamentosas e/ou a persistência de resíduos potencialmente tóxicos na carne de animais tratados e que são destinados para consumo, ou mesmo no ambiente, serem necessários no processo de desenvolvimento e autorização de novas drogas veterinárias (BRASIL, 2004; EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2001, 2018; UNITED STATES, 1938), o presente estudo trata da eficácia do citral adicionado à água como sedativo e anestésico em jundiá (*Rhamdia quelen*) e carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Também trata da segurança de procedimentos anestésicos induzidos pelo OE de *A. citriodora* e pelo citral em

jundiá. Além disso, trata do efeito protetor do OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá contra a inoculação experimental de *Aeromonas hydrophila*.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 A aquicultura, a piscicultura e, a produção e comércio de carne de peixe e derivados

Aquicultura é a criação, recria e coleta de peixes, mariscos, plantas, algas, entre outros organismos, em todos os tipos os ambientes aquáticos. Compreende incubatórios, pisciculturas e instituições de pesquisa. Embora também produza iscas para pesca esportiva, peixes ornamentais e espécies para reposição ambiental, a aquicultura foi considerada pela “Food and Agriculture Organization” (FAO), das Nações Unidas, levando em consideração as diretrizes do Acordo de Paris sobre o clima (United Nations Framework Convention on Climate Change, UNFCCC), como atividade essencial na nutrição e segurança alimentar das populações humanas (AMERICAN FISHERIES SOCIETY, 2019; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018).

Piscicultura é o cultivo de peixes. A produção global da aquicultura, incluindo plantas aquáticas, em 2016 foi de 110 200 000 toneladas, sendo 54 100 000 toneladas de peixe para consumo. A espécie de peixe mais criada em nível mundial foi a carpa-capim, com 11% do total, seguida da carpa-prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), da carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), com 10%, 8% e 8% da produção total, respectivamente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018).

No Brasil, a piscicultura corresponde a 82% da produção da aquicultura (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2015) e a produção de peixes para consumo avançou para 758.006 toneladas em 2019, crescendo 4,9% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2020). A tilápia-do-Nilo é a espécie mais criada para consumo, com 57% da produção nacional. Além disso, as espécies nativas somaram 38% da produção total, já as outras espécies exóticas criadas no Brasil, além da tilápia-do-Nilo, somaram os 5% restantes (PEIXE BR, 2020).

As outras espécies de peixes criadas para consumo que são importantes para a piscicultura nacional são tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambacu (peixe híbrido entre tambaqui e pacu), tambatinga (peixe híbrido entre a fêmea do tambaqui e o macho da pirapitinga, *Piaractus brachypomus*), truta arco-íris

(*Oncorhynchus mykiss*), panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) e as carpas comum, prateada e capim, entre outras espécies criadas em menor quantidade (PEIXE BR, 2020).

Praticamente toda a produção de peixes cultivados para consumo no Brasil é destinada ao mercado interno e diversos problemas atrasam o desenvolvimento da piscicultura nacional. Problemas básicos de sanidade e estrutura como a falta de água, ou dificuldades para o processamento e comercialização da carne e derivados, são verificados localizadamente. Problemas na regulação de todo o sistema também são verificados, como normativas diversas que são aplicadas nos diferentes Estados da Federação, dificuldades para obtenção de licenciamento ambiental, entre outras dificuldades ligadas à legislação específica vigente, que tem baixa conformidade com padrões internacionais, principalmente quanto aos procedimentos para o desenvolvimento e autorização de novas drogas para uso em peixes (BRASIL, 1969, 2004, 2015, 2016, 2017; EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2001, 2018; PEIXE BR, 2020; UNITED STATES, 1938, 1996, 2004).

1.2.2 As drogas veterinárias autorizadas para uso em peixes

A busca por melhores índices de produtividade na piscicultura leva a um aumento na densidade de estocagem dos peixes criados nos viveiros. O estresse ocasionado pelo pouco espaço disponível para os animais leva a uma maior tendência para o acúmulo de resíduos tóxicos como amônia, entre outros produtos, além da diminuição do oxigênio dissolvido na água. Esses fatores são deletérios para a saúde dos peixes e predispõe os mesmos à ocorrência de doenças. Perdas econômicas significativas podem ocorrer em decorrência destes problemas (BALDISSEROTTO et al., 2014; JØRGENSEN et al., 2017).

Drogas veterinárias são produtos que se aplicam ou administram a qualquer animal para fim terapêutico, profilático, de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas ou de comportamento, sendo essenciais no manejo sanitários dos animais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019). É desejável a disponibilidade de um número finito de substâncias comprovadamente seguras para os seres humanos e para o ambiente e, seguras e eficazes para os animais, autorizadas como drogas veterinárias específicas pelas agências reguladoras de drogas, para o manejo sanitário das espécies de peixes criadas para consumo nos diferentes países ou blocos de países. Também é desejável, resguardadas as necessidades locais, que estes plantéis de drogas específicas, bem como as características e os usos aprovados para as mesmas estejam em conformidade entre as diferentes regiões, no intuito de diminuir custos e facilitar a livre circulação da carne, derivados e das próprias drogas. Além disso, apesar de

ser desejável a disponibilidade de um plantel finito de drogas veterinárias específicas, esta lista deve ser abrangente em relação às necessidades sanitárias e de bem-estar dos animais (BRASIL, 1969, 2004, 2015, 2016, 2017; CODEX COMMITTEE ON RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS, 1986; EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2001, 2018; UNITED STATES, 1938, 1996, 2004).

As drogas disponíveis para uso em piscicultura incluem classes terapêuticas como antibióticos, antiparasitários, desinfetantes para uso direto sobre os animais e outras substâncias terapêuticas, além de sedativos, anestésicos, vacinas, marcadores teciduais, hormônios manipuladores de gênero e auxiliares de desova, entre outros usos para hormônios. As drogas de origem molecular são usadas principalmente na cura de doenças e outras condições patológicas, entre outros usos como sedação e manipulação hormonal, já as drogas de origem biológica, cuja maioria são vacinas, são usadas principalmente em caráter preventivo (AMERICAN FISHERIES SOCIETY, 2019; FISHMEDPLUS COALITION, 2017).

A escassez de drogas para uso em peixes criados para consumo resulta em problemas sanitários e de bem-estar animal (CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2007, 2020; FISHMEDPLUS COALITION, 2017). Diversas lacunas de indicações para drogas, onde existe escassez ou mesmo inexistência de drogas autorizadas para uso, foram verificadas na Europa, onde, além da baixa disponibilidade de vacinas, também se verifica escassez de substâncias para o tratamento de ectoparasitoses causadas por protozoários dos Gêneros *Ichthyophthirius* e *Ichthyobodo*, protistas do Gênero *Paramoeba*, vermes platelmintos da Classe Monogenea e pequenos crustáceos do Gênero *Lepeophtheirus*, endoparasitoses diversas, doenças bacterianas causadas pelos Gêneros *Aeromonas* e *Flavobacterium*, doenças fúngicas e oomicóticas e doenças virais, além de, hormônios, sedativos e anestésicos (FISHMEDPLUS COALITION, 2017).

Visando aumentar a disponibilidade de drogas veterinárias específicas para uso em peixes criados para consumo, as agências reguladoras de drogas dos Estados Unidos e Europa, a “Food and Drug Administration” (FDA) e a “European Medicines Agency” (EMA), respectivamente, consideram a piscicultura como um mercado menor, em relação ao mercado das drogas. O mesmo ocorre em relação às espécies de peixes criadas para consumo, que são consideradas espécies menores, em relação ao mercado das drogas. Nos Estados Unidos, são consideradas espécies menores os animais que não são espécies maiores, que são bovinos, cavalos, porcos, galinhas, perus, cães e gatos. Na Europa, espécies menores são outras que não bovinos, ovinos para produção de carne, porcos, galinhas, cães e gatos. O processo de desenvolvimento e autorização de novas drogas para uso em mercados menores, ou espécies

menores são elegíveis para subsídios por parte das agências de drogas, que facilitam e desoneram os patrocinadores de novos produtos. A facilitação e desoneração da autorização de novos usos para drogas já autorizadas para comércio também é possível pelo procedimento previsto para mercados e espécies menores (MUMS) (UNITED STATES, 2004).

No Brasil, a regulamentação vigente não prevê nenhum dispositivo semelhante à designação como MUMS para estimular o desenvolvimento e autorização de novas drogas, ou novos usos para drogas já autorizadas para comércio no país (BRASIL, 1969, 2004, 2012; 2015, 2016). A portaria nº 72 de 2 de junho de 2017 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que é a agência encarregada da regulação das drogas veterinárias no Brasil, instituiu o termo Inovação Radical para denominar as novas drogas que resultaram da autorização de novos princípios ativos no Brasil e, o termo Inovação Incremental para denominar os novos usos desenvolvidos para drogas já autorizadas para comércio. Os pedidos de autorização que forem referentes à autorização de novas drogas ou novos usos para drogas já autorizadas tem preferência, em detrimento da ordem cronológica, em relação aos demais pedidos de autorização para outros tipos de produtos veterinários no Brasil (BRASIL, 2017).

No Brasil¹, Estados Unidos² e Europa³ estão disponíveis para o público, as relações de todas as drogas veterinárias autorizadas para uso em peixes criados para consumo. O compêndio local é uma iniciativa conjunta da Secretaria de Defesa Agropecuária com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN). Algumas dezenas de drogas, de origem molecular e biológica, estão disponíveis para comercialização nos Estados Unidos e também na Europa. No Brasil estão disponíveis poucas drogas específicas, sendo apenas uma vacina cujo antígeno é o *Streptococcus agalactiae*. Cabe considerar que a aplicação desta vacina precisa ser realizada com os peixes anestesiados, embora não exista nenhuma substância sedativa e anestésica autorizada para uso em peixes criados para consumo no Brasil.

¹ Disponível em <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/>. Acessado em 20/11/2020

² Disponível em <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs> e <https://www.usda.gov/>. Acessados em 20/11/2020

³ Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/national-registers-authorized-medicines> e <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/clynav>. Acessados em 20/11/2020

1.2.3 A planta *Aloysia citriodora* Paláu

A planta *Aloysia citriodora* Paláu⁴, com sinônimos *Aloysia citrodora* Ortega ex Pers., *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton, *Aloysia triphylla* Royle, *Aloysia triphylla* f. *serrulata* Moldenke, *Aloysia sleumeri* Moldenke, *Cordia microcephala* Willd. ex Roem. & Schult., *Lippia citriodora* (Palau) Kunth, *Lippia citriodora* Kunth, *Lippia triphylla* (L'Hér.) Kuntze, *Verbena triphylla* L'Hérit, *Verbena citriodora* Cav., *Verbena citriodora* (Palau) Cav., *Verbena fragrans* Salisb. e *Zappania citriodora* (Palau) Lam., popularmente conhecida no Brasil como cidrô, nos Países de Língua Espanhola da América do Sul como “cedrón” e em Inglês como “lemon verbena”, entre outras denominações, é um arbusto da família Verbenaceae que possui folhas e flores ricas em OEs (Figuras 1-4). Nativa do sul da América do Sul, com controvérsias sobre sua origem exata, a planta cresce naturalmente nas regiões mais centrais do continente, como as províncias Argentinas de La Pampa, San Luiz, San Juan, La Rioja, Catamarca, Tucumán, Salta e Jujuy, se espalhando para regiões contíguas mais ao sul da Bolívia e Paraguai (BATTISTI et al., 2013; BOTTA, 1979; CEBALLOS; PERÉA, 2014; DELL VITTO; PETENATTI; PETENATTI, 1997; HILGERT; GIL, 2006; O'LEARY et al., 2016; STEIBEL, 2000). Não foram identificados registros da *A. citriodora* crescendo naturalmente no Brasil a partir dos estudos do Botânico e Naturalista Augustin François César Prouvençal de Saint-Hilaire, que catalogou mais de 24000 espécimes de plantas nativas Brasileiras (SAINTHILAIRE, 1824, 1825; SAINTH-ILAIRE; JUSSIEU; CAMBESSEDES, 1829, 1832). Além disso, a *A. citriodora* foi classificada como planta exótica no Brasil por diversos autores (BALDAUF et al., 2009; BATTISTI et al., 2013; HEINDRICKSON et al., 2010; HISTER et al., 2010). Em sentido diverso à maioria dos estudos sobre a origem da planta, Dorigoni et al. (2001) classificam a *A. citriodora* como espécime Brasileira.

O uso da *A. citriodora* como planta medicinal teve origem com índios Sul-Americanos que compartilharam seus conhecimentos com os colonizadores Europeus, criando uma cultura mista que difundiu o uso desta e de outras plantas medicinais pelo continente. A *A. citriodora* foi levada para a Europa no século XVII pelos navegadores Espanhóis e o nome do gênero *Aloysia* foi uma homenagem para Maria Luiza de Parma, esposa de Carlos IV, rei da Espanha à época (ALONSO; DESMACHERLIER, 2015; CÁCERES; SINGER, 2000; MAFFEI, 1969).

Atualmente, a *A. citriodora* tem sido cultivada e consumida em todo o mundo como alimento, bebida e tempero. Na medicina popular tem sido usada na confecção de chás, infusões

⁴ Disponível em <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-6894>. Acessado em 20/11/2020

e outras apresentações no tratamento de várias condições como reumatismo, febre, influenza, distúrbios digestivos e do coração. Também são registradas ações antiespasmódica, carminativa, diurética e sedativa, entre outras (BAHRAMSOLTANI et al., 2018; BALDAUF et al., 2009; BASSOLS; GURNI, 1996; BATTISTI et al., 2013; CARMONA et al., 2005; DORIGONI et al., 2001; HEINDRICKSON et al., 2010; HISTER et al., 2010; JAMILA; MOSTAFA, 2014; MAIA et al., 2011; MERÉTIKA; PERONI; HANAZAKI, 2010; RITTER et al., 2002; SANTOS et al., 2015; SANTOS-GOMES; FERNANDES-FERREIRA; VICENTE, 2005). Além disso, a *A. citriodora* tem relevância mundial, em medicina popular, no tratamento da colibacilose, causada pela bactéria *Escherichia coli* (AMINZARE et al., 2017).

Figura 1 – A planta *Aloysia citriodora* Paláu. Visão em distância



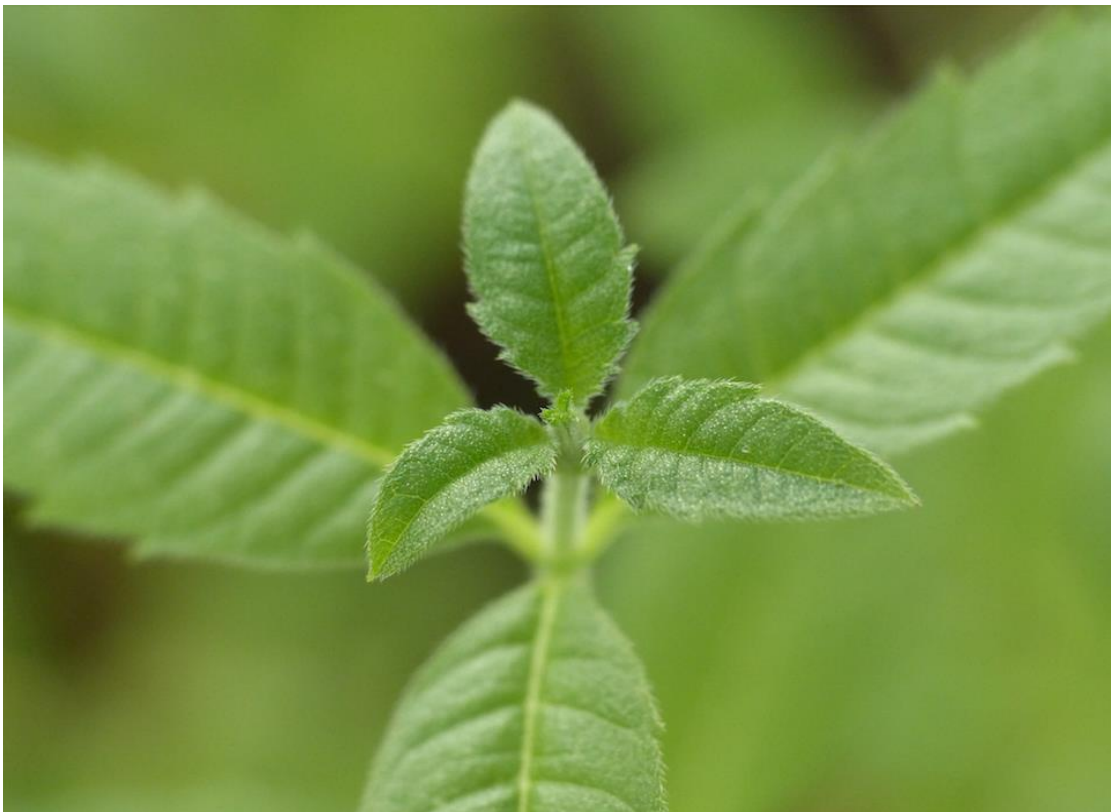
Fonte: Internet. Disponível em <https://www.planfor.pt/comprar,lucia-lima,1130,PO>. Acessado em 13/05/2020.

Figura 2 – A planta *Aloysia citriodora* Paláu. Detalhe das folhas e flores



Fonte: Internet. Disponível em <https://www.easytogrowbulbs.com/collections/culinary-plants/products/aloyia-triphylla-lemon-verbena?variant=31581507020>. Acessado em 13/05/2020.

Figura 3 – A planta *Aloysia citriodora* Paláu. Detalhe da brotação



Fonte: Internet. Disponível em http://canopybridge.com/bepro_listings/lemon-verbena-lemon-beebush-aloyia-citriodora-lemongrass-cymbopogon-citratu/. Acessado em 13/05/2020.

Figura 4 – A planta *Aloysia citriodora* Paláu.



Fonte: New York Botanical Garden (NYBG) Steere Herbarium. Disponível em <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen-details/?irn=3499490>. Acessado em 13/11/2020.

1.2.4 O óleo essencial da *Aloysia citriodora* Paláu e o citral

Os OEs são produtos do metabolismo secundário de plantas e servem como mecanismo de defesa destas contra agressões externas. A composição química do OE sintetizado pela *A. citriodora*, assim como todos os OEs de plantas, varia entre amostras cultivadas em localidades e ambientes diversos, originando diferentes quimiotipos que são classificados de acordo com a composição química majoritária de cada OE. Outros fatores como a idade da planta, parte utilizada para a extração do OE ou a época da colheita também afetam a composição final do produto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em Portugal (SANTOS-GOMES; FERNANDES-FERREIRA; VICENTE, 2005) e no sul do Brasil o citral tem sido verificado como componente mais abundante do OE de *A. citriodora*, com o limoneno sendo frequentemente o segundo componente mais abundante (DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2014). Em OEs extraídos de cultivares da Argentina e do Paraguai, além do citral, o limoneno também tem sido verificado como componente mais abundante (OLIVA et al., 2009; RICCIARDI et al., 2011). Além dos quimiotipos citral e limonene verificados na América do Sul e Portugal, no Marrocos foram identificados mais três diferentes quimiotipos de *A. citriodora* que tiveram ar-curcumeno, β -espatulenol e óxido de trans-cariofileno como componentes mais abundantes. O citral também foi verificado como um dos componentes dos OEs das cultivares marroquinas, embora minoritário em todas elas (OUKERROU et al., 2017).

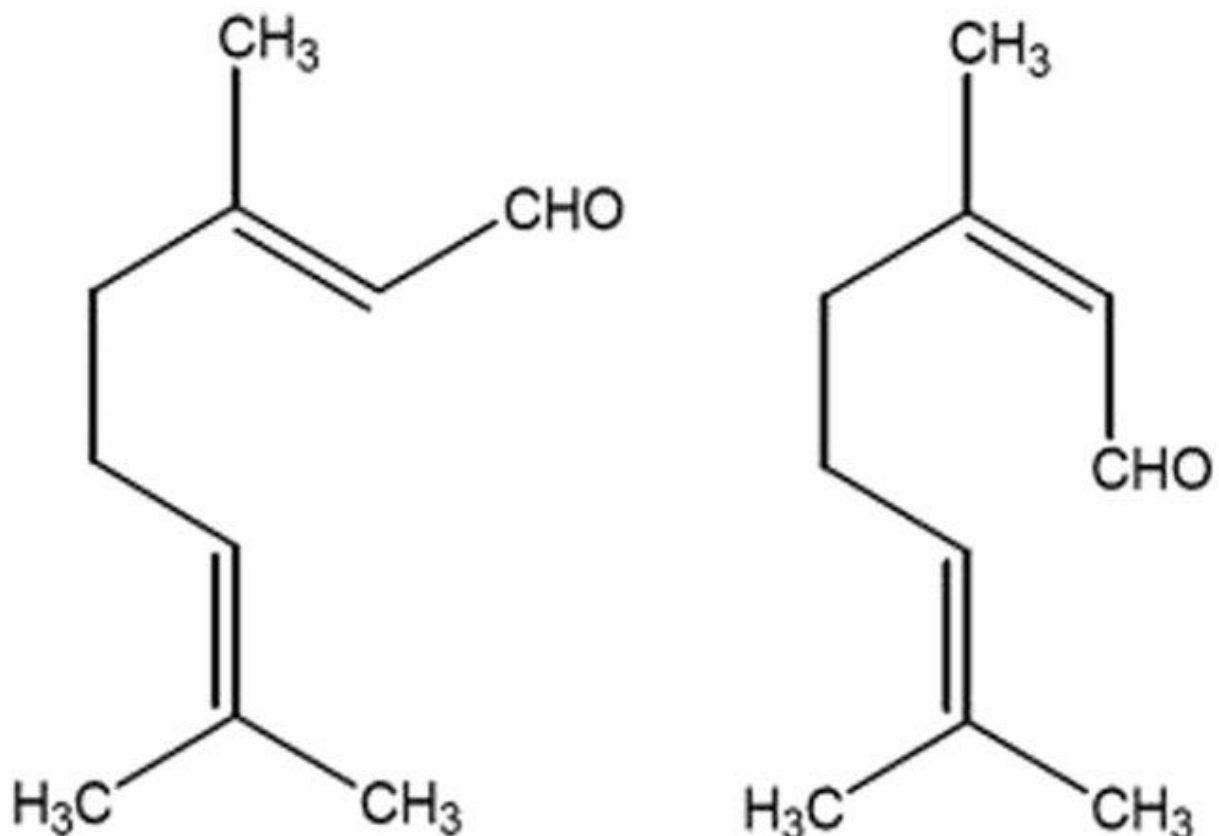
O OE de *A. citriodora* tem ação comprovada em peixes como antioxidante (ZEPPENFELD et al., 2017), sedativo, anestésico (DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2014) e modulador do crescimento corporal (ZEPPENFELD et al., 2016). Todos os OEs utilizados nestes estudos foram extraídos de plantas cultivadas no Rio Grande do Sul e, embora tenham apresentado variações quantitativas, todas as análises demonstraram o citral como o componente mais abundante presente. A tabela 1 traz a composição do OE de *A. citriodora* utilizado por Zeppenfeld et al. (2016).

Em plantas cultivadas no Município de Frederico Westphalen durante dois anos consecutivos e que foram colhidas de acordo com as quatro estações do ano, estabelecendo quatro diferentes grupos de análise, a composição química do OE da *A. citriodora* apresentou em todas as amostras citral, limoneno, cariofileno, cariofileno óxido e espatulenol como componentes mais abundantes dos extrativos verificados. Variações na quantidade dos componentes mais abundantes foram verificadas a partir das amostras provenientes das

diferentes épocas do ano, sugerindo que os efeitos fisiológicos induzidos pelo OE possam variar de acordo com a época de colheita das plantas (PARODI et al., 2020).

O citral é uma mistura de dois monoterpênos acíclicos, o α -citral (citral a, geranial) e o β -citral (citral b, neral) (Figura 5). Além de ser o componente mais abundante do OE de *A. citriodora* quimiotipo citral, esta substância também é o componente mais abundante do OE de *Cymbopogon flexuosus* (SANTOS et al., 2017) e do OE de *Lippia alba* quimiotipo citral (SOUZA et al., 2018). Em camundongos albinos (*Mus musculus*), utilizado isoladamente, o citral apresentou ação sedativa e relaxante muscular (VALE et al., 2002). Em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) o citral isoladamente apresentou ação *in-vitro* como bloqueador neuromuscular, sendo considerado uma substância promissora no desenvolvimento de um novo anestésico local (SOUSA et al., 2015).

Figura 5 – A estrutura química do citral. À esquerda o α -citral (citral a, geranial) e à direita o β -citral (citral b, neral)



Fonte: ALAM et al. (2018). In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug citral. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/323362721_In_vitro_DNA_binding_studies_of_therapeutic_and_prophylactic_drug_citral. Acessado em 13/11/2020.

Tabela 1 – Composição química do OE de *A. citriodora* utilizado por Zeppenfeld et al. (2016), onde **α -citral** e **β -citral (citral)** foram verificados como componentes mais abundante presentes

(continua)

Constituintes	%	IKr	IKc
β -pineno	1.07	964	969
3-octanol	0.29	971	971
Limoneno	11.90	1017	1010
Cis-ocimeno	0.83	1027	1030
α -óxido de pineno	0.10	1090	1081
Linalol	0.69	1090	1084
Myrtanal	0.30	1126	1123
Citronelal	0.76	1146	1132
Isopulegol	0.19	1146	1140
2-pinen-4-ol	1.46	1155	1154
Pulegona (p-Menth-4(8)-en-3-ona)	0.44	1168	1164
α -terpineol (p-menth-1-en-8-ol)	2.24	1179	1173
Cis geraniol	0.51	1217	1220
Citronelol ou linalol acetate	1.34	1228	1225
β-citral	20.78	1240	1240
Trans- geraniol	0.55	1259	1249
α-citral	29.41	1271	1274
δ -elemeno	0.13	1331	1333
Acetato de nerilo	0.35	1364	1363
α -cubebeno	0.16	1367	1377
Acetato de geranil	2.98	1384	1385
Cariofileno	5.64	1418	1422
α -cariofileno	0.29	1459	1456
Aromadendreno	0.17	1463	1463
Acoradieno	0.18	1471	1478
Propionato de geranil	1.13	1475	1485
D Germacreno	1.55	1481	1487
Biciclogermacreno	1.16	1495	1502
β -bisaboleno	0.57	1507	1517
cis- α -bisaboleno	0.24	1509	1519
τ -cadineno	0.15	1521	1522
δ -cadineno	0.11	1527	1529
Nerolidol	0.78	1564	1575

Tabela 1 – Composição química do OE de *A. citriodora* utilizado por Zeppenfeld et al. (2016), onde α -citral e β -citral (citral) foram verificados como componentes mais abundante presentes

Constituintes	%	IKr	(conclusão)
			IKc
Espatuleno	0.58	1586	1589
Óxido de cariofileno	2.33	1594	1593
Cubenol	3.29	1604	1598
Cedrol	0.16	1613	1604
Humulano-1,6-dien-3-ol	0.28	1619	1624
τ -cadinol	1.72	1648	1658
α -Bisabolol	0.38	1682	1672
Cedr-8-en-13 ol	0.23	1688	1689
Total identificado	97.42		

IKr = índice retenção referencial; IKc = índice de retenção calculado; % = percentual relativo

1.2.5 As substâncias com ação sedativa e anestésica para uso em peixes

Práticas realizadas em piscicultura como procedimentos reprodutivos, biometria, coleta de sangue e material para análises diversas, implante hormonal, transporte, entre outros procedimentos comuns na criação de peixes, expõe os animais a uma variedade de fatores estressantes, que incidem em desequilíbrios orgânicos e podem resultar em atraso no crescimento, ou mesmo a morte dos animais. São significantes os prejuízos financeiros decorrentes das doenças e outras condições patológicas que são facilitados pelo estresse causado por estes procedimentos (BARTON, 2000). O uso de drogas sedativas e anestésicas amenizam o estresse decorrente do manejo dos peixes, sendo importantes para a saúde e bem-estar dos animais, além de proporcionar boas condições de trabalho para aqueles que os manuseiam, sejam em atividades comerciais, de pesquisa ou reposição de espécimes para o ambiente. Logo, o interesse pelos procedimentos sedativos e anestésicos em peixes vem ganhando espaço na literatura científica. (BECKER et al., 2017; CUNHA et al., 2010a; GRESSLER et al., 2014, 2015; PARODI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012; ZEPPENFELD et al., 2014).

A eficácia de procedimentos anestésicos em peixes pode ser avaliada pelos tempos de indução e recuperação de anestesia (GILDERHUS; MARKING, 1987; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008; SCHOETTGER; JULIN, 1967; SMALL, 2003). A anestesia é um

ato contínuo à sedação e o estabelecimento de padrões identificáveis durante a indução dos procedimentos varia de acordo com as observações de cada autor e com as características de cada espécie de peixe (ROSS; ROSS, 2008) (Figura 6). A Tabela 2 foi adaptada de Small (2003) e mostra os critérios adotados no presente estudo para a avaliação dos procedimentos de sedação e anestesia realizados.

Embora diferentes necessidades surjam a partir dos diversos procedimentos executados na rotina com peixes, certas características são consideradas desejáveis para qualquer agente anestésico (MARKING; MEYER, 1985). Durante o transporte é desejável a redução do consumo de oxigênio e das perdas iônicas por parte dos animais (GRESSLER et al., 2015; PARODI et al., 2014; ZEPPEFELD et al., 2014). É desejável que um anestésico para peixes seja eficaz em imobilizar rapidamente os animais, assim como a recuperação do procedimento também deve ser rápida (GILDERHUS; MARKING, 1987; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008; SMALL, 2003). Para Marking e Meyer (1985) e Ross e Ross (2008) anestesia rápida deve ser induzida em período igual ou inferior a 3 min, já a recuperação de anestesia deve ocorrer em período igual ou menor que 5 min. O mesmo é preconizado por Gilderhus e Marking (1987) para o tempo máximo de indução para anestesia, embora o tempo de recuperação considerado ideal possa ser inferior a 10 min, e não 5 min. Small (2003) corrobora 3 min ou menos para indução rápida de anestesia, mas não refere nada em relação ao tempo de recuperação desejável para os procedimentos. Períodos de recuperação anestésica mais longos têm sido recomendados para a realização de procedimentos cirúrgicos (ROUBACH et al., 2005).

Durante os procedimentos de sedação e anestesia não devem ocorrer intercorrências como aumento de tônus muscular, hiperatividade, contrações musculares involuntárias, ataxia, hipersecreção de muco, danos às córneas, pele e mucosas dos animais. Além disso, o agente sedativo e anestésico deve ser amplamente disponível, econômico e, apresentar baixa ou nenhuma toxicidade para os animais e para o ambiente. Para peixes destinados ao consumo, não pode ocorrer acúmulo de substâncias tóxicas na carne e derivados destes animais (AYDINA; BARBAS, 2020; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008).

O foco inicial do estudo com sedativos e anestésicos para peixes ficou concentrado em substâncias sintéticas como uretano, clorobutanol, tricafina metanossulfonato (MS-222), hidrato de cloral, fenobarbital, quinaldina, metomidato, benzocaína e etomidato, entre outras (KAZUŃ; SIWICKI, 2012; MATTSON; RIPPLE, 1989; MC'FARLAND, 1959; NELSON, 1953; SCHOETTGER; JULIN, 1967, 1969). Presentemente, devido à alta incidência de câncer e outras doenças acometendo as pessoas, assim como o aumento das preocupações com o meio

ambiente, tem se verificado um aumento no interesse em produtos à base de plantas, como alternativas às drogas sintéticas. Os extrativos vegetais mais utilizados como sedativos e anestésicos em peixes são OEs e fitoquímicos isolados desses OEs (AYDINA; BARBAS, 2020; HOSEINI; MIRGHAED; YOUSEFI, 2019).

Diversos OEs de plantas e componentes isolados destes OEs têm eficácia comprovada como agentes sedativos e anestésicos em diferentes espécies de peixes, demonstrando cada agente em particular características mais ou menos desejáveis na indução e recuperação dos procedimentos, além de maior ou menor quantidade de efeitos colaterais observáveis (AYDINA; BARBAS, 2020; HOSEINI; MIRGHAED; YOUSEFI, 2019). O óleo de cravo extraído da planta *Syzygium aromaticum* (*Eugenia aromaticum* ou *Eugenia caryophyllata*) é provavelmente a substância natural mais estudada por sua ação sedativa e anestésica em peixes. O eugenol é o componente mais abundante do óleo de cravo (PŘÍBORSKÝ; VELÍŠEK, 2018).

O óleo de cravo em estado bruto e o eugenol têm eficácia comprovada como sedativos e anestésicos em diversas espécies de peixes como neon (*Paracheirodon axelrodi*), acará-severo (*Heros severus*), acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), “medaka” (*Oryzias latipes*), peixe-dourado (*Carrassius auratus*), carpa-comum, “rabbitfish” (*Siganus lineatus*), bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) e salmão-vermelho (*Oncorhynchus nerka*) (CHANSEAU et al., 2002; CUNHA et al., 2010a; ENDO et al., 1972; FUJIMOTO et al., 2018; GONÇALVES et al., 2008; HIKASA et al. 1986; HOLLOWAY et al., 2004; JAVAHERY; NEKOUBIN; MORADLU, 2012; PŘÍBORSKÝ; VELÍŠEK, 2018; SOTO; BURHANUDDIN, 1995; WATERSTRAT, 1999; WOODY; NELLSON; RAMSTAD, 2002).

Além do óleo de cravo, outros OEs de plantas têm eficácia comprovada na indução de sedação e anestesia em peixes. São exemplos o OE de *A. citriodora* (BECKER et al., 2017; DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2014), *C. flexuosus* (SANTOS et al., 2017), *L. alba* (CUNHA et al., 2010b; SOUZA et al., 2018), *Ocimum gratissimum* (SILVA et al., 2012), *Hyptis mutabilis* (SILVA et al., 2013a), *Ocotea acutifolia*, *Hesperozygis ringens* e *Lippia sidoides* (SILVA et al., 2013b), *Aloysia gratissima* (BENOVIT et al., 2015), *Menta piperita* (CAN; SÜMER, 2019; METIN et al., 2015), *Lavandula angustifolia* (CAN; SÜMER, 2019), *Pelargonium graveolens* (CAN et al., 2018) e *Ocimum micranthum*, (ZEPPENFELD et al., 2019).

Além do eugenol, outros componentes isolados de OEs foram eficazes na indução de sedação e anestesia em peixes. São exemplos o S-(+)-linalol (HELDWEIN et al., 2014), timol

e carvacrol (BIANCHINI et al., 2017), mentol (GONÇALVES et al., 2008), *E*-(-)-pinocamfona, (-)-Cariofileno oxido, (-)-guaiol e (+)-espatulenol (BENOVIT et al., 2015), globulol e 1-terpinen-4-ol (SILVA et al., 2013a).

Considerando Estados Unidos e Europa, existem apenas três substâncias com atividades sedativa e anestésica autorizadas para uso no manejo sanitário de peixes destinados para consumo. No Brasil, não existe nenhuma droga autorizada para esse fim. O MS-222 é a única droga sedativa e anestésica autorizada para uso em peixes destinados para consumo nos Estados Unidos, onde tem registro com o nome comercial “Tricaine-S”. Na União Européia, o MS-222 é comercializado na Grécia, Islândia, Irlanda, Itália, Noruega e Reino Unido, sendo conhecida comercialmente como “Tricaine”, “Finquel vet” e “Nytox vet”, dependendo do país referido. A benzocaína é comercializada na Grécia, Portugal e Espanha com o nome “Aquacen Benzocaine” e na Noruega como “Benzoak vet”. O isoeugenol é comercializado na Islândia e Noruega com o nome “Aqui-S vet” (SANTOS; CUNHA, 2021). No Brasil existe regulamentação para o uso de anestésicos como agentes de eutanásia, em peixe utilizados na pesquisa acadêmica apenas. Diversos produtos são citados como possíveis agentes de eutanásia em peixes no Brasil, sendo exemplos MS-222, benzocaína, 2-fenoxietanol, óleo de cravo e eugenol (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2018).

Figura 6 – Peixe anestesiado. Detalhe da aeração constante do aquário durante o procedimento



Fonte: Internet. Disponível em <https://www.koihealth.org/Veinipuncture/Anesthesia.html>. Acessado em 13/05/2020.

Tabela 2 – Estágios de anestesia em peixes

Estágio	Características
1	Diminuição da atividade natatória e/ou diminuição da resposta a estímulos externos
2	Peixes permanecem no fundo do aquário ou apresentam perda parcial de equilíbrio e/ou natação errática
3	Ausência de movimentação e resposta aos estímulos externos
4	Colapso medular (morte)

Fonte: Adaptado de Small (2003).

1.2.6 O uso do óleo essencial da *Aloysia citriodora* Paláu e do citral como sedativos e anestésicos para peixes

O OE de *A. citriodora* adicionado à água dos aquários foi eficaz na indução de sedação e anestesia em jundiá das variedades cinza e albino (DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014, 2020; SANTOS et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2014), tilápia-do-Nilo (TEIXEIRA et al., 2017) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) (BECKER et al., 2017). Até o momento da realização do presente estudo, não estava disponível nenhum relato estabelecendo a ligação definitiva do citral com o efeito sedativo e anestésico verificado para o OE de *A. citriodora* em peixes e, para Parodi et al. (2020), o efeito anestésico do OE de *A. citriodora* em jundiá é resultado de interação entre componentes diversos.

Considerando o período máximo de exposição de 30 min na tentativa de indução de anestesia em jundiá, tilápia-do-Nilo e pacamã, em jundiá foi induzida sedação, sem alcançar o estágio de anestesia, a partir de 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ (SANTOS et al., 2017) e, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ (PARODI et al., 2014) OE de *A. citriodora*. Em tilápia-do-Nilo e pacamã, sedação apenas foi verificada a partir de 20, 30, e 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ (TEIXEIRA et al., 2017) e 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ (BECKER et al., 2017), do OE de *A. citriodora*, respectivamente.

Em estudos sobre transporte de peixes, sedação apenas foi induzida a partir de concentrações do OE de *A. citriodora* que variaram entre 12,5 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$, sem registro de mortalidade à curto prazo durante os períodos propostos em jundiá das variedades cinza e albino, tilápia-do-Nilo e pacamã (BECKER et al., 2017; PARODI et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2014). Em transporte simulado durante 5 h foi possível diminuir a regurgitação decorrente do procedimento em jundiá cinza e albino, a partir de concentrações de 30, 40 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Apesar da concentração de $50 \mu\text{L L}^{-1}$ ter sido estressora, por ter induzido aumento significativo do cortisol corporal total na variedade cinza, a perda de Na^+ , Cl^- e K^+ dos animais para a água foi significantivamente diminuída na variedade albina, assim como Na^+ e Cl^- na variedade cinza, o que favoreceu os balanços iônicos dos animais tratados (PARODI et al., 2014).

Em jundiá, as concentrações de 30 e $40 \mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *A. citriodora* adicionado à água foram efetivas em induzir sedação, durante o período proposto de 6 h para o transporte simulado, e preveniram o estresse do procedimento, o que foi verificado pela diminuição da liberação de cortisol plasmático, diminuição do desequilíbrio iônico plasmático (perda de Na^+ e Cl^- e acúmulo de K^+ corporais) e pelo incremento do status oxidativo no plasma, músculo e cérebro dos animais. Também se verificou diminuição da amônia total excretada na água de transporte em relação ao grupo controle (sem adição de OE), indicando redução do metabolismo dos animais tratados durante os procedimentos (ZEPPENFELD et al., 2014).

Para Becker et al. (2017), as concentrações de 12,5 e $25 \mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *A. citriodora* foram eficazes em induzir sedação, durante o período proposto de 4 h para o transporte simulado em pacamã. A amônia total e o oxigênio dissolvidos na água foram menores nos grupos com adição de OE à água de transporte, em relação ao controle sem adição de OE. Além disso, a frequência respiratória verificada no grupo tratado com $25 \mu\text{L L}^{-1}$ foi menor que a verificada nos outros grupos (controle, 12,5 e $25 \mu\text{L L}^{-1}$), indicando redução no metabolismo dos animais tratados durante o procedimento. Apesar da verificação da diminuição da hemoglobina no grupo tratado com $12,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e aumento da mesma no grupo tratado com $25 \mu\text{L L}^{-1}$, o hematócrito não foi afetado pela adição de OE à água.

O OE de *A. citriodora* foi eficaz em induzir anestesia sem mortalidade a curto prazo, a partir de concentrações variando entre 100 a $800 \mu\text{L L}^{-1}$ em jundiás das variedades cinza e albino, sendo que nas concentrações de $200 \mu\text{L L}^{-1}$ e $400 \mu\text{L L}^{-1}$ foi eficaz em induzir anestesia em período inferior a 3 min, com tempo de recuperação anestésica inferior a 10 min (PARODI et al., 2014). O mesmo relativo à mortalidade e tempos de indução e recuperação anestésica foi verificado por Santos et al. (2017), na concentração de $300 \mu\text{L L}^{-1}$, em jundiá. Gressler et al. (2014) verificaram que concentrações de 150 e $200 \mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *A. citriodora* não foram capazes de induzir anestesia em período inferior a 3 min, embora a recuperação anestésica tenha sido inferior a 10 min na maior concentração utilizada, em jundiá.

Em tilápia-do-Nilo, anestesia sem mortalidade a curto prazo foi induzida em concentrações variando entre 80 a $450 \mu\text{L L}^{-1}$, sendo que nas concentrações de 300 e $450 \mu\text{L L}^{-1}$ os tempos de indução e recuperação anestésica ficaram abaixo de 3 min e 5 min, respectivamente, com $300 \mu\text{L L}^{-1}$ sendo considerada a concentração anestésica ideal para

indução de anestesia rápida, por ser a mínima concentração efetiva capaz de alcançar o efeito desejado. Além disso, filés provenientes de animais tratados com $300 \mu\text{L L}^{-1}$ mantiveram suas características organolépticas (gosto e odor) após os tratamentos com o OE de *A. citriodora* (TEIXEIRA et al., 2017).

Em pacamã, anestesia sem mortalidade a curto prazo foi induzida em concentrações de 50 a $400 \mu\text{L L}^{-1}$, sendo que na concentração de $400 \mu\text{L L}^{-1}$ foram verificados tempos de indução e recuperação anestésica inferiores a 3 e 10 min, respectivamente, sendo considerada a concentração ideal para anestesia rápida (BECKER et al., 2017).

De forma geral, os protocolos anestésicos realizados a partir do OE de *A. citriodora* em peixes mostraram que o aumento da concentração utilizada diminui o tempo necessário para a indução de sedação e anestesia. O contrário ocorre em relação ao tempo de recuperação dos procedimentos. Além disso, não foram relatadas manifestações clínicas indesejáveis como hiperatividade exacerbada, espasmos musculares, entre outras manifestações indesejáveis durante a indução e recuperação dos procedimentos (BECKER et al., 2017; DANIEL et al., 2016; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; ZEPPEFELD et al., 2014).

Procedimentos anestésicos induzidos a partir do OE de *A. citriodora* em jundiá demonstraram ação preventiva contra a liberação de cortisol para o sangue, além de estimular a capacidade antioxidante orgânica e prevenir a lipoperoxidação hepática nos animais (GRESSLER et al., 2014). Em tilápia-do-Nilo, a indução de anestesia pelo OE de *A. citriodora*, assim como o verificado para o jundiá por Gressler et al. (2014), preveniu a liberação de cortisol plasmático, indicando atenuação do estresse intrínseco aos procedimentos realizados (TEIXEIRA et al., 2017).

1.2.7 As substâncias com ação antimicrobiana para uso em peixes

Infecções por bactérias são um risco comum associado ao estresse intrínseco induzido pela busca de cada vez maiores índices de produtividade na piscicultura (BARTON, 2000). A liberação de catecolaminas e cortisol corpóreos que ocorre em associação como o estresse em peixes é associada ao desenvolvimento de patologias secundárias, frequentemente causadas por bactérias oportunistas para estes animais (BAKER; GOBUSH; VYNNE, 2013; CABELLO, 2006; CABELLO et al., 2013).

As bactérias saprófitas que vivem na água, além de colonizarem os próprios tecidos dos peixes, habitam sedimentações, plantas e outros microrganismos maiores. Algumas bactérias

facilitam a digestão, estimulando positivamente a imunidade dos animais hospedeiros. O desenvolvimento de doenças bacterianas em peixes é um processo multifatorial, não dependendo apenas das bactérias, mas também do estado imunológico dos animais. Mudanças que ocorrem no ambiente dos peixes de água doce parecem ser fundamentais no desenvolvimento de qualquer doença, podendo condicionalmente reverter à bactéria patogênica, organismos antes inofensivos (JOHNSON; PAULL, 2011).

Sem considerar as características específicas de cada espécie de peixe, como o desenvolvimento de doenças nestes animais depende em grande parte das condições climáticas prevalentes em uma determinada região, diferentes doenças tendem a ocorrer em diferentes ecossistemas, assim como algumas bactérias tendem a ocasionar infecções em certas regiões (OLESEN; VENDRAMIN, 2016). Tradicionalmente, bactérias gram-negativas como *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. e *Shewanella putrefaciens*, além de bactérias gram-positivas como *Lactococcus garviae* e *Streptococcus iniae*, têm sido associadas à infecção em peixes de água doce. Já *Plesiomonas shigelloides*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Kocuria rhizophila* têm sido associadas com infecções emergentes nestes animais (PEKALA-SAFIŃSKA, 2018).

Em nível mundial, as substâncias com atividade antimicrobiana disponíveis como drogas autorizadas para uso em peixes criados para consumo são antibióticos, substâncias desinfetantes e vacinas. Os antibióticos disponíveis têm como vias de administração o uso interno ou apresentações para aplicação direta na água dos animais (banho medicamentoso), já os desinfetantes são autorizados para banho medicamentoso apenas. No Brasil⁵ estão disponíveis para comércio florfenicol, colistina (polimixina E) e oxitetraciclina. Nos Estados Unidos estão disponíveis florfenicol, oxitetraciclina e sulfadimetoxina/ormetoprim. Na Europa, flumequina, enrofloxacino, florfenicol, ácido oxolínico, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfadiazina/trimetoprim, sulfadoxina/trimetoprim e amoxicilina (SANTOS; CUNHA, 2021). Diversos nomes comerciais podem ser verificados para as drogas com ação antimicrobiana autorizados para uso em peixes criados para consumo no Brasil, Estados Unidos e Europa. A droga veterinária “Aquaflor”, à base de florfenicol, de propriedade da “MSD Animal Health”⁶ é a única apresentação comercial autorizada nas três regiões.

Substâncias desinfetantes como peróxido de hidrogênio e formalina estão disponíveis para uso em peixes criados para consumo nos Estados Unidos e Europa. O mesmo ocorre com diversas vacinas contra doenças causadas por bactérias como *A. hydrophila*, *A. salmonicida*,

⁵ Disponível em <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/>. Acessado em 20/11/2020

⁶ Disponível em <https://www.msd-animal-health.com/>. Acessado em 20/11/2020

Lactococcus garvieae, *Listonella anguillarum*, *Vibrio ordali*, *Yersinia ruckeri*, *Photobacterium damsela*, *Streptococcus parauberis*, *Tenacibaculum maritimum*, *Moritella viscosa*, *Renibacterium salmoninarum*, *Edwardsiella ictaluri* e *Flavobacterium columnare* (SANTOS; CUNHA, 2021). No Brasil está disponível apenas uma vacina para peixes, contra infecções causadas pelo *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-Nilo (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL, 2021).

O uso profilático e terapêutico de antibióticos na piscicultura traz preocupações com o desenvolvimento de resistência microbiana (CABELLO et al., 2013; MILLER; HARBOTTLE, 2017). Aproximadamente 80% dos antibióticos autorizados para uso em animais aquáticos, como é o caso das quinolonas e tetraciclínas, entram no ambiente com sua atividade intacta, podendo induzir mutações no mecanismo de resistência de bactérias encontradas no ambiente. A resistência adquirida pode ser transmitida de bactéria para bactéria, gerando e disseminando cepas resistentes (CABELLO et al., 2013).

Devido à escassez de drogas com ação antimicrobiana autorizadas para uso em peixes, principalmente para os animais destinados ao consumo, além das problemáticas relacionadas com o uso de antibióticos, a busca por novas alternativas se faz necessária (CABELLO, 2006; CABELLO et al., 2013; CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2020; FISHMEDPLUS COALITION, 2017; MILLER; HARBOTTLE, 2017). O interesse em substâncias naturais que tenham ação antimicrobiana contra patógenos de interesse veterinário têm crescido nos últimos anos (EBANI; MANCIANTI, 2020). Por ser desejável que os novos produtos antimicrobianos sejam ecologicamente sustentáveis (CABELLO, 2006), o uso de substâncias naturais tem sido considerado como alternativa aos antibióticos tradicionalmente utilizados em peixes (SANTOS; CUNHA, 2021; SUTILI et al., 2015, 2016).

Diversos OEs de plantas, entre outros extrativos vegetais em estado bruto, têm demonstrado ação contra bactérias específicas que causam infecções em peixes, são os casos dos OEs de espanta-pulga (*Hesperozygis ringens*), alfavaca (*O. gratissimum*) e basil (*Ocimum americanum*) (SUTILI et al., 2015, 2016), *Eucalyptus globulus* (PARK; WENDT; HEO, 2016), orégano grego (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*), orégano espanhol (*Thymbra capitata*) e salgado de Creta (*Satureja thymbra*) (ANASTASIOU et al., 2020), citronela (*Cymbopogon nardus*) (WEIL; WEE, 2013), cravo-da-Índia (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2009), canela (*Cinnamomum zeylanicum/verum*), orégano compacto (*Origanum compactum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) (HAYATGHEIB et al., 2020) e árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*) (BALDISSERA et al., 2017), além dos extratos de *Rhus javanica* (KIM et al., 2014) e própolis (ORSI et al., 2017).

Os principais grupos de fitoquímicos que são componentes dos extrativos vegetais em estado bruto e que são responsáveis pela ação antimicrobiana das plantas são terpenos, fenólicos, ácidos fenólicos, saponinas, cumarinas, quinonas, flavonoides, alcaloides e taninos (GYAWALIA; IBRAHIM, 2014).

1.2.8 A ação antimicrobiana do OE de *A. citriodora* Paláu

Através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que foi realizada para diversos OEs de plantas (*A. citriodora*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris*, *Origanum applii*, *O. vulgare*, *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum*), contra diversas bactérias e a levedura *Candida albicans*, segundo Sartoratto et al. (2004), o OE de *A. citriodora* demonstrou forte ação inibitória contra *Enterococcus faecium* ATCC 10541 e *Bacillus subtilis*, ação moderada contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* e, ação fraca contra *E. faecium* CCT5079, *Rhodococcus equi* e *Micrococcus luteus*. Embora o OE de *A. citriodora* tenha sido o único OE testado a apresentar ação inibitória considerável (moderada) contra *C. albicans*, nenhuma ação inibitória foi verificada contra *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*. A partir do mesmo método de avaliação da atividade antimicrobiana utilizado por Sartoratto et al. (2004), Duarte et al. (2005) também verificaram ação moderada do OE de *A. citriodora* contra o crescimento de *C. albicans*.

Utilizando o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (procedimento com discos ou antibiograma), segundo Ali, El-Beltagi e Nasr (2011), o OE de *A. citriodora* demonstrou forte inibição do crescimento de *B. subtilis* e *C. albicans*, inibição moderada para *S. aureus* e, inibição fraca para os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma reesei*. Nenhuma ação inibitória foi registrada para as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, além do fungo *Trichoderma viride*.

Oliva et al. (2009), utilizando antibiogramas e o fracionamento do OE em seus diversos componentes por cromatografia, demonstraram que cinco diferentes amostras do OE de *A. citriodora*, derivados de plantas cultivadas em quatro diferentes regiões da Argentina e uma região do Paraguai, tiveram maior ação inibitória contra bactérias gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* e *M. luteus*), em relação às bactérias gram-negativas testadas (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*). A ação do OE de *A. citriodora* também variou juntamente com o percentual dos fitoquímicos mais abundantes presentes em cada amostra e, como já mencionado na seção 1.2.4, todas tiveram citral e

limoneno, respectivamente, como componentes mais abundantes verificados (OLIVA et al., 2009).

Os OEs de *A. citriodora* derivados de plantas colhidas em cinco diferentes regiões do Marrocos, como já mencionado anteriormente na seção 1.2.4, tiveram ar-curcumeno, β -espatulenol e óxido de trans-cariofileno como componentes mais abundantes verificados. A ação antibacteriana das amostras foi verificada pelas avaliações do antibiograma e da concentração bactericida mínima (CBM). De maneira geral, as amostras de OE de *A. citriodora* apresentaram ação moderada contra *S. aureus* e *E. coli*, embora nenhuma ação contra *P. aeruginosa* tenha sido verificada (OUKERROU et al., 2017).

Ebani et al. (2019), através da determinação da CIM, verificaram que o OE de *A. citriodora* demonstrou baixa capacidade de inibição do crescimento de *Salmonella entérica*, sorotipos Enteritidis e Typhimurium isolados de aves e relacionados frequentemente com a salmonelose humana (EBANI et al., 2019). O mecanismo primário da inibição *in-vitro* do crescimento do *S. aureus* pelo OE de *A. citriodora* é o dano causado à membrana citoplasmática, que leva a alterações morfológicas e funcionais, resultando na morte da bactéria (OLIVA et al., 2015).

São escassos os estudos sobre a ação do OE de *A. citriodora* contra bactérias relacionadas com infecções em peixes. Souza et al. (2017) verificaram a ação bactericida do OE de *A. citriodora* contra isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de pacamã e tilápia-do-Nilo, pela determinação da CMB. O OE foi eficaz na redução da formação de biofilme bacteriano ainda não consolidado, em isolados bacterianos fracos ou moderados produtores de biofilme. Também foi verificada ação sinérgica do OE de *A. citriodora* com o florfenicol contra *Aeromonas* spp., reduzindo a CMB efetiva do antibiótico capaz de inativar as bactérias. Além disso, não se tratando do OE de *A. citriodora* em estado bruto, o citral demonstrou ação *in-vitro* contra *A. hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii* e *Raoultella ornithinolytica* isolados de jundiá (BANDEIRA JUNIOR et al., 2018).

1.2.9 As infecções por *Aeromonas* spp. em peixes

A taxonomia das bactérias *Aeromonas* spp. é complexa. Iniciada em 1943 e em constante mudança, inicialmente o gênero foi classificado por sua expressão fenotípica, sendo incluído na família Vibrionaceae, juntamente com *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp. e *Plesiomonas* spp. Com o avanço dos estudos, as investigações filogenéticas indicaram que as

bactérias deveriam formar sua própria família, então denominada como família *Aeromonadaceae* (COLWELL; MACDONELL; DE LEY, 1986).

A família *Aeromonadaceae* é formada por bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas e quimioorganotróficas, com uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 22 a 28°C. Geralmente elas são móveis por flagelação polar, capazes de reduzir nitratos a nitritos e, catabolizar glicose e vários carboidratos a ácidos e gases (POPOFF, 1984).

As *Aeromonas* spp. são bactérias ubíquas transmitidas pela água. Amostras foram isoladas de águas marinhas, rios, lagos, pântanos, sedimentos, água com cloro, sistemas de distribuição de água, água potável e águas residuais, especialmente durante os meses mais quentes (KIROV, 1997), sendo frequentemente associadas com septicemia hemorrágica em animais de sangue frio, incluindo peixes, répteis e anfíbios (AUSTIN; AUSTIN, 2016). Os principais fatores patogênicos associados às *Aeromonas* spp. são polissacarídeos de superfície (cápsula, lipopolissacarídeo e glucana), camadas S, sistemas de ligação de ferro, exotoxinas e enzimas extracelulares, sistemas de secreção, fímbrias, motilidade e, flagelos e outras adesinas não filamentosas (TOMÁS, 2012). Para Pridgeon e Klesius (2012), as doenças associadas com bactérias *Aeromonas* spp. estão entre as mais prevalentes em peixes, incidindo em prejuízos financeiros consideráveis para a piscicultura mundial.

Bactérias *Aeromonas* spp. são patógenos oportunistas que causam infecções em animais submetidos a situações de estresse. Diferentes manifestações clínicas são documentadas em peixes acometidos por infecções por *Aeromonas* spp. As infecções por aeromonas móveis também são conhecidas como septicemia por aeromonas móveis (SAM), infecção por aeromonas móveis (MAI), septicemia hemorrágica, peste vermelha, doença da ferida vermelha (CAMUS et al., 1998), doença ulcerativa e doença do apodrecimento da cauda e da barbatana (STRATEV; ODEYEMI, 2017). As *Aeromonas* móveis frequentemente relacionadas com infecções em peixes são *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. Veronii* (CAMUS et al., 1998; MONIR et al., 2020). As infecções por aeromonas não móveis em salmonídeos são chamadas de furunculose e a espécie associada à doença é a *Aeromonas salmonicida* (CAMUS et al., 1998).

A *A. hydrophila* é a espécie mais comumente observada em associação com infecções por aeromonas móveis. Espécies de peixes de água doce e salgada são suscetíveis à doença. A infecção por aeromonas móveis se manifesta clinicamente com hemorragias, ulcerações, abscessos, efusões cavitárias e anemia. As taxas de mortalidade são altas e incorrem em perdas econômicas substanciais, necessitando de medidas oportunas de prevenção e tratamento (STRATEV; ODEYEMI, 2017) (Figura 7). Devido ao amplo cultivo para consumo, a infecção

por aeromonas móveis em tilápia (*Oreochromis* spp) dá relevância mundial para a doença (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018; MONIR et al., 2020).

Na Europa Continental e nos Países Mediterrâneos, as infecções por aeromonas móveis estão entre as principais doenças que acometem as principais espécies de peixes criados para consumo, como carpas, robalo ou “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) e dourada ou “sea bream” (*Sparus aurata*) (OLESEN; VENDRAMIN, 2016). Na Índia a infecção por aeromonas móveis é epizootica, *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. sóbria* foram detectadas em 51.64%, 21.97% e 18.68%, respectivamente, dos isolados bacterianos provenientes de peixes, principalmente carpas (Cyprinidae), acometidos por sintomatologia característica da doença. As amostras foram coletadas em várias regiões da Índia durante o período de 2 anos consecutivos (SAHARIA et al., 2020).

A *A. hydrophila* foi associada com infecções em espécies de peixes criados para consumo como ayu (*Plecoglossus altivelis*), carp (*Cyprinus carpio*), bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), bagre-ambulante (*Clarias batrachus*), enguia-japonesa (*Anguilla japonica*), enguia-americana (*Anguilla rostrata*), moela-americana (*Dorosoma cepedianum*), carpa-dourada (*Notemigonus crysoleucas*), cabeça-de-cobra (*Ophiocephalus striatus*), tilápia-do-Nilo, além dos salmonídeos, salmo trutta ou truta-marrom (*Salmo trutta*), truta-arco-íris e salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) e, do peixe-dourado que é uma espécie ornamental (AOKI, 1999). Outras espécies ornamentais de peixes foram associadas a infecções por aeromonas móveis: colisa ou gourami (*Colisa lalia*), colisa ou gourami-gigante (*Osphronemus goramy*), acará-disco, tetra-negro (*Gymnocorymbus ternetzi*), plati (*Xiphophorus maculatus*), barbus-tigra (*Barbus pentazona hexazona*), guppy (*Poecilia reticulata*) e Pangasius (*Pangasius sutchi*) (MUSA et al., 2007).

A furunculose associada à *A. salmonicida* subespécie *salmonicida* cursa com sepsse hemorrágica, lesões ulcerativas, petéquias e morte em salmonídeos (DALLAIRE-DUFRESNE et al., 2014). Na Europa, a furunculose tem sido verificada como um dos maiores problemas relacionados em truta-arco-íris e salmões criados em fazendas (OLESEN; VENDRAMIN, 2016).

A patogenia da *A. salmonicida* se inicia pela entrada da bactéria no organismo dos salmonídeos por via cutânea, intestinal ou pelas brânquias. Após, ocorre a difusão da bactéria para os rins, fígado, baço e cérebro do hospedeiro. *A. salmonicida* infecta leucócitos, eritrócitos e exibe uma fase extracelular no sangue. A fase intra-eritrocitária parece ser importante na

disseminação da bactéria pelo organismo dos peixes acometidos (VALDERRAMA et al., 2019).

Em seres humanos, a *A. hydrophila* produz potentes enterotoxinas com atividades citotóxica e hemolítica, podendo causar doenças intestinais ou extra-intestinais, chamando a atenção para o caráter zoonótico da infecção (EROVA et al., 2007). Além disso, a síndrome hemolítico-urêmica tem sido associada à infecção por *A. hydrophila* em crianças (BOGDANOVIĆ et al., 1991; ROBSON; LEUNG; TREVENEN, 1992) e endocardite tem sido associada a infecção por *A. salmonicida* em seres humanos adultos (SALEHI et al., 2019).

Figura 7 – Necrose de nadadeira e úlcera cutânea em jundiá infectado com *A. hydrophila*



Fonte: arquivo pessoal de Guerino Bandeira Júnior (Mestre em Farmacologia Aplicada à Produção Animal pela UFSM).

1.2.10 Os modelos experimentais

Modelos experimentais são utilizados em pesquisa acadêmica para representar partes de sistemas mais complexos. Para tanto, devem apresentar uma precisão adequada, verificada por meio de comprovação prévia e também pela demonstração das limitações do procedimento (FERREIRA; FERREIRA, 2003). Em pesquisa biológica os modelos *in-vitro* (culturas de células, tecidos, entre outros procedimentos) e *in-vivo* (animais de laboratório) são amplamente

utilizados para fundamentar as hipóteses formuladas pelos pesquisadores (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Uma espécie-modelo é um organismo estudado por uma comunidade de pesquisadores. Isto ocorre para espécies que tem características adequadas para a experimentação, possibilitando o entendimento de algum processo biológico que ocorre em outras espécies de interesse, normalmente organismos mais diferenciados. Cada espécie-modelo é escolhida por demonstrar características que a tornam adequada para alguns estudos, ainda que não todos os estudos. A busca pela espécie-modelo mais adequada é conhecida como o princípio de August Krogh, que postula que: “Para cada problema biológico existe um organismo no qual é mais conveniente realizar o estudo” (MOYES; SCHULTE, 2010).

O jundiá é um peixe teleósteo de água doce, da ordem *Siluriformes*, família *Heptapteridae*, que pode atingir 50 cm de comprimento e 3kg de peso, possui hábito noturno, habita locais calmos e profundos dos rios, apresenta alimentação onívora, com tendência piscívora e atinge a maturidade sexual no primeiro ano de vida. Os adultos são ovulíparos, preferindo desovar em águas limpas, calmas e com fundo pedregoso. Não apresenta cuidado parental e possui dois picos reprodutivos por ano, um no verão e outro na primavera (GOMES et al., 2000) (Figuras 8 e 9).

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado a cinza. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (SILFVERGRIP, 1996). Espécie endêmica na América do Sul, por ser adaptada ao frio do inverno e ter um crescimento rápido durante os meses quentes (espécie euritérmica), é adequada para piscicultura no sul da América do Sul ou qualquer outra região de clima temperado ou subtropical (PEREIRA et al., 2006).

Também é conhecido no Brasil como jundiá-tinga, mandi e sapiroca e, na Argentina como bagre, bagre-negro, bagre-sapo e bagre-sul-americano (GOMES et al., 2000). A maioria das criações de jundiá do Brasil estão localizadas no Rio Grande do Sul, seguido de Santa Catarina e Paraná (PEIXE BR, 2020). Alevinos de jundiá suportam grandes variações de salinidade (até 9,0 g/L⁻¹ durante 96 horas) e do pH da água (4,0 a 8,5), sendo que o pH ideal para o crescimento de larvas é de 8,0 a 8,5 (GOMES et al., 2000).

O jundiá tem sido utilizado como modelo experimental para estudos aplicados à piscicultura, incluindo o tratamento de doenças (SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2016; SUTILI et al., 2015, 2016), melhoramento zootécnico e de parâmetros fisiológicos (PÊS et al., 2016; SACCOL et al., 2013; SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2015), sedação e anestesia (BENOVIT et al., 2015; BIANCHINI et al., 2017; GARLET et al., 2016; GRESSLER et al.,

2014; HELDWEIN et al., 2014, SILVA et al., 2017), entre outros propósitos como estudos com viés ambiental (MATHIAS et al., 2018) e sobre fisiologia de peixes (SOUZA et al., 2019).

A carpa-capim é originária e tem sido importante na alimentação da China há séculos, sendo que os cientistas e agências governamentais chineses acumularam grande experiência, conhecimento e dados sobre o assunto. A espécie pertence à subfamília *Squaliobarbinae* da família *Cyprinidae* e é o único membro do gênero *Ctenopharyngodon*, se caracterizando pela ausência de barbilhões, uma boca terminal e ligeiramente oblíqua, 38 a 47 escamas moderadas a grandes junto com uma linha lateral completa e, 2 fileiras de dentes faríngeos fortemente serrilhados e comprimidos lateralmente com sulcos paralelos proeminentes. Uma carpa-capim herbívora típica da China tem um corpo alongado dominado por uma cor brilhante esverdeada, dorso levemente cinza-azulado, nadadeira cinza-clara e ventre branco-acinzentado. No entanto, a coloração pode variar com habitat, alimentação e genética de cada peixe (ZHAO et al., 2020) (Figuras 10 e 11).

Na china a carpa-capim é chamada “Tsao Yu”, “Hwuan Yu” ou “Bai Hwuan” (ZHAO et al., 2020). Como já mencionado na seção 1.2.1, esta é a espécie de peixe mais criada para consumo em nível mundial (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018). No Brasil, as carpas criadas para consumo ainda são pouco difundidas (< 5% do total de peixes criados para consumo), sendo criadas principalmente no Rio Grande do Sul (PEIXE BR, 2020).

A invasão dos rios e lagos da América do Norte pela carpa-capim tem causado preocupações. A espécie foi introduzida no sul dos Estados Unidos na década de 1960 para controlar macrófitas aquáticas em tanques de aquicultura. A liberação acidental de exemplares provenientes de algumas instalações de pesquisa e fazendas de aquicultura no início da introdução, seguida pela ampla promoção da estocagem de peixes triploides e diplóides, ajudou a facilitar a expansão da área invadida pela espécie na América do Norte. Recentemente, demonstrando a adaptabilidade da espécie em novos ambientes, observou-se que a carpa capim se reproduzia no Lago Erie, um dos cinco grandes lagos da América do Norte, na divisa entre os Estados Unidos e o Canadá. (ZHAO et al., 2020).

Estudos sobre sedação e anestesia a partir de etomidato e OE de *Ocimum micranthum* estão disponíveis para a carpa-capim (KAZUŃ; SIWICKI, 2012; ZEPPENFELD et al., 2019). Além disso, a espécie tem sido utilizada em estudos sobre toxicologia (DAR et al., 2020; XU et al., 2020).

Figura 8 – O Jundiá (*Rhamdia quelen*). Peixes juvenis



Fonte: United States Geological Survey (USGS), United States Government. Disponível em <https://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?SpeciesID=839>. Acessado em 13/11/2020.

Figura 9 – O Jundiá (*Rhamdia quelen*). Peixe adulto



Fonte: United States Geological Survey (USGS), United States Government. Disponível em <https://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?SpeciesID=839>. Acessado em 13/11/2020.

Figura 10 – A carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Peixe juvenil



Fonte: United States Geological Survey (USGS), United States Government. Disponível em <https://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=514>. Acessado em 13/11/2020.

Figura 11 – A carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*). Peixe adulto



Fonte: United States Geological Survey (USGS), United States Government. Disponível em <https://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=514>. Acessado em 13/11/2020.

1.2.11 Determinações hematológicas e bioquímicas

A maior parte da pesquisa sobre saúde e doenças de peixes tem se concentrado nas espécies criadas para consumo. À medida que a sociedade reconhece a necessidade de conservar e proteger seus recursos naturais, cada vez mais instalações de aquários públicos, produtores comerciais de peixes ornamentais, coletores e aquaristas amadores estão seguindo o exemplo

da piscicultura para consumo e melhorando as práticas de saúde empregadas com estes animais (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

Determinações hematológicas e bioquímicas são amplamente utilizados na medicina veterinária para verificar a condição orgânica dos animais. A determinação hematológica mais comum é o hemograma, que consiste na avaliação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas presentes no sangue. Os exames bioquímicos compreendem a determinação de diversas substâncias presentes no sangue, como enzimas, metabólitos, proteínas, lipídeos, carboidratos e íons, entre outras substâncias. Na busca do diagnóstico das doenças e outras condições patológicas que acometem os animais, entre outros propósitos, as provas bioquímicas são complementares às provas hematológicas e vice-versa. (STOCKHAM; SCOTT, 2008).

Os distúrbios hematológicos são marcados por alterações nas contagens e estrutura das células sanguíneas. Embora muitas doenças possam ser refletidas pelo sangue, as anormalidades das hemácias, leucócitos e plaquetas são consideradas distúrbios primários. As doenças dos peixes podem resultar em anemia, leucopenia, leucocitose, trombocitopenia, entre outras anormalidades das células do sangue (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

O hemograma completo, ou partes deste, tem sido utilizado para avaliar diversos aspectos relacionados à saúde dos peixes, como as respostas hematológicas de: carpa-comum e tainha-olhalvo (*Mugil cephalus*) à exposição a produtos tóxicos como o herbicida glifosato (Roundup) (KONDERA et al., 2018) e, óxidos de cobre (AKBARY; YARAHMADI; JAHANBAKHSI, 2018) e arsênico (FAZIO et al., 2019), respectivamente; truta-coral (*Plectropomus leopardos*), truta-arco-íris e “victoria labeo” (*Labeo victorianus*) à suplementação alimentar com a cianobactéria *Spirulina platensis* (YU et al., 2018), curcumina (YONAR et al., 2019) e urtiga (*Urtica dioica*) (NGUGI et al., 2015), respectivamente; traíra (*Hoplias malabaricus*) aos fármacos diclofenaco e dexametazona (RIBAS; ZAMPRONIO; ASSIS, 2016); pacu-caranha ou pacuguaçu (*Piaractus mesopotamicus*) parasitado pelo monogenídeo *Anacanthorus penilabiatus* (JERÔNIMO et al., 2014); carpa-prussiana (*Carassius gibelio*) infectada pelo Herpesvírus Ciprinídeo tipo 2 (LU; LU; CAO, 2016); “victoria labeo” (*Labeo victorianus*), truta-arco-íris, tilápia-do-Nilo, tilápia-de-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) e, peixe-dourado e carpa-comum, suplementados oralmente com pó de urtiga (*Urtica dioica*) (NGUGI et al., 2015), extrato metanólico aquoso de “tetra” (*Cotinus coggygria*), (BILEN; ELBESHTI, 2019), pó de própolis (ORSI et al., 2017), pó de folhas de acácia-branca (*Moringa oleífera*) (MBOKANE; MOYO, 2019) e, extrato de *Azadirachta indica*, *Oscimum sanctum* e *Curcuma longa* (HARIKRISHNAN;

BALASUNDARAMB; HEO, 2010a, b), respectivamente, infectados experimentalmente por cepas de *A. hydrophyla*.

Hemogramas também têm sido utilizados como ferramentas para verificar a segurança de procedimentos anestésicos realizados a partir de diferentes substâncias, em diversas espécies de peixes, como: óleo-de-cravo em truta-arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), “european catfish” (*Silurus glanis* L.), “vimba breams” (*Vimba vimba*), “pikeperch” (*Sander lucioperca* L.) e barbus (*Barbus barbus*) (KŘIŠT’AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; PŘÍBORSKÝ et al., 2015; VELÍŠĚK et al., 2005; 2006; VELÍŠĚK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2005); etomidato em truta-arco-íris, “vimba breams”, “pikeperch”, barbus e carpa-comum (KAZUŇ; SIWICKI, 2012; KŘIŠT’AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; WITESKA; DUDYK; JARKIEWICZ, 2015); MS-222 em “vimba breams”, “pikeperch” e barbus (KŘIŠT’AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; PŘÍBORSKÝ et al., 2015); 2-fenoxietanol em truta-arco-íris, “vimba breams”, “european catfish” e barbus (LEPIC et al., 2014; PŘÍBORSKÝ et al., 2015; VELÍŠĚK et al., 2007; VELÍŠĚK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2007).

Perfis bioquímicos têm sido utilizados em peixes para avaliar: a resposta orgânica de truta-arco-íris à suplementação oral com silimarina (BANAEI et al., 2011); a condição nutricional, dano tecidual e estresse induzido pela migração de salmão-rei (WAGNER; CONGLETON, 2004); a toxicidade de substâncias como o alumínio em tilápia-vermelha (*Tilapia zillii*) (HADI; SHOKR; ALWAN, 2009); a resposta orgânica de tilápia-de-Moçambique (MBOKANE; MOYO, 2019), carpa-comum (JAGRUTHI et al., 2014), peixe-dourado e carpa-comum (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAMB; HEO, 2010a, b), à suplementação oral com pó de folhas de acácia branca, astaxantina e, extrato de *Azadirachta indica*, *Oscimum sanctum* e *Curcuma longa*, respectivamente, contra a infecção experimental por *A. hydrophyla*; à toxicidade induzida por procedimentos anestésicos a partir do 2-fenoxietanol em carpa-comum (VELÍŠĚK; SVOBODOVÁ, 2004), óleo de cravo, etomidato, 2-fenoxietanol e MS-222 em truta-arco-íris, “pikeperch” e “vimba bream”, respectivamente (KŘIŠT’AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; VELÍŠĚK et al., 2011), 2-fenoxietanol em carpa-comum e truta-arco-íris (VELÍŠĚK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2007).

Os eritrócitos circulantes nos peixes normalmente apresentam núcleo. Devido a isto, estas células não são destruídas no procedimento usual utilizado para a contagem de células sanguíneas de mamíferos, não podendo ser distinguidos dos leucócitos (RANZANI-PAIVA et al., 2013; TAVARES-DIAS et al., 2002; THRALL, 2007). Na busca de um método facilmente aplicável para avaliar quantitativamente as células do sangue de galinhas, Natt e

Herrick (1952) desenvolveram um diluente que possibilitou a diferenciação dos três tipos de células sanguíneas quando visualizadas ao mesmo tempo no hemocítmetro. A composição química do diluente pode ser verificada na figura 11. A solução de Natt e Herrick possui a propriedade de corar os eritrócitos ovais pela cor violeta, com o citoplasma roxo menos acentuado. Uma vez que a forma do eritrócito é característica, nenhuma dificuldade é encontrada para diferenciá-lo do leucócito e da plaqueta. As determinações hematológicas em peixes vêm sendo desenvolvidas a partir do verificado anteriormente para as galinhas, com algumas adaptações como a diluição em 1/200, já que na diluição de 1/100 pode ocorrer aglomeração de células no campo de contagem (THRALL, 2007). O peixe teleósteo *Maurolicus milleri* é exceção entre os animais não-mamíferos, apresentando eritrócitos circulantes desprovidos de núcleo (WINGSTRAND, 1956).

Figura 12 – Composição química do diluente desenvolvido por Natt e Herrick (1952) para a determinação do número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas de galinha no hemocítmetro

The diluent consists of the following:

NaCl.....	3.88 g.
Na ₂ SO ₄	2.50 g.
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O.....	2.91 g.
KH ₂ PO ₄	0.25 g.
Formalin (37%).....	7.50 cc.
Methyl Violet 2B.....	0.10 g.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos gerais

Verificar a eficácia do citral adicionado à água como sedativo e anestésico em jundiá e carpa-capim.

Verificar a segurança do OE de *A. citriodora* e do citral como indutores de anestesia em jundiá.

Verificar o efeito protetor do OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá contra a inoculação experimental de *A. hydrophila*.

1.3.2 Objetivos específicos

Verificar os tempos necessários para indução de sedação e anestesia e, os tempos de recuperação de anestesia, induzidos por diferentes concentrações de citral adicionado à água em jundiá e carpa capim.

Verificar parâmetros hematológicos, bioquímicos e de mortalidade para procedimentos anestésicos longos, com manutenção de anestesia, induzidos pelo OE de *A. citriodora* e pelo citral em jundiá.

Verificar o efeito do OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá através de determinações hematológicas e bioquímicas.

Verificar o efeito protetor do OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá contra a inoculação experimental de *A. hydrophila*, através de determinações hematológicas, bioquímicas e de mortalidade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MANUSCRITO 1 E MANUSCRITO 2

2.1.1 Manuscrito 1

O manuscrito 1 intitulado “*Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection” encontra-se publicado como “Short communication” no periódico “Fish & Shellfish Immunology” (Qualis B1 no quadriênio 2013–2016 na Ciências Biológicas II).



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

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

Short communication

Aloysia triphylla essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection



Alessandro C. dos Santos, Fernando J. Sutili, Berta M. Heinzmann, Mauro A. Cunha, Isabel C.M. Brusque, Bernardo Baldisserotto, Carla C. Zeppenfeld*

Pharmacology Postgraduate Program, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2016

Received in revised form

5 January 2017

Accepted 22 January 2017

Available online 22 January 2017

Keywords:

Phytochemical

Diet

Hematology

Survival

Bacteria

ABSTRACT

The essential oil of *Aloysia triphylla* (EOAT) is a promising product with potential use in aquaculture systems. This study evaluated hematological/biochemical responses and survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed a diet containing EOAT and infected by *Aeromonas hydrophila*. After 21 days of feeding trial, fish were infected with *A. hydrophila* following a 10-day period of observation. Blood collection was performed before and after the bacterial challenge. Dietary EOAT by itself seems to affect some blood parameters, decreasing total leukocyte, lymphocyte, and neutrophil counts and increasing total protein values. However, 2.0 mL EOAT/kg diet showed a possible potential protective effect after *A. hydrophila* infection, maintaining the evaluated parameters similar to basal values (from healthy fish before the feeding trial) and promoting survival of silver catfish.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In animal production, the potential development of antibiotic-resistant bacteria has resulted in the development of non-antibiotic (more environmentally friendly and less risky to human health) feed additives that may also improve animal health and performance [1–3]. In aquaculture industry and research, there has been an increased interest in the use of plant-derived products, such as plant essential oils (EO), as feed additives for fish [4–7]. Due to the component diversity of EOs, these plant products present diverse and relevant biological activities (e.g. antimicrobial, anti-parasitic, antioxidant, immunomodulatory and anesthetic/sedative) [2,7–9]. EOs affect the host in a number of ways, mainly modulating blood/immune and other physiological responses [7], showing potential to be applied as new generation compounds for animal health and nutrition [2,3,9].

Due to the chemical diversity and possible interactions among the molecules, EOs not only may affect the host but they can act directly on the bacterial cell. Most of the described antibacterial effects of the EOs and their constituents involve interactions with biological membranes, such as changes in the morphology and lipid profile of bacterial cell membrane, increasing membrane permeability and leading to disruption with cytoplasmic leakage [10]. In

addition, they may also act, at subinhibitory concentrations, suppressing mechanisms of resistance or virulence factors developed by pathogens [10,11].

Aloysia triphylla (L'Herit.) Britton is a shrub in the Verbenaceae family with aromatic leaves and flowers that are used for medicinal purposes [12] and food seasoning. Antibacterial, anesthetic/sedative, antistress, antioxidant and growth promoter activities have been reported for *Aloysia triphylla* EO (EOAT) for different aquatic animal species [12–16]. This study assessed the survival and hematological/biochemical responses of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed a diet containing EOAT following *Aeromonas hydrophila* challenge.

Extraction of EOAT as well as constituent identification were performed as stated by Zeppenfeld et al. [15]. The major components of EOAT were determined to be (%): b-citral (20.78) and a-citral (29.41). Silver catfish (148.2 ± 16.9 g, 25.5 ± 0.4 cm) were obtained from a local fish farm (Santa Maria, RS, Brazil) and maintained at the Fish Physiology Laboratory (Federal University of Santa Maria). Fish were acclimated to experimental conditions for 10 days prior to the feeding trial and were then randomly distributed as groups of five fish (three treatments and three replicates) into nine tanks (50 L each) with individual aeration, operated as a closed recirculating system with biological/mechanical filtration. Three diets with different levels of EOAT (0.0 - control, 0.25, or 2.0 mL EOAT per kg of diet) were formulated based on the study of

* Corresponding author.

E-mail address: carlazeppenfeld@hotmail.com (C.C. Zeppenfeld).

Zeppenfeld et al. [15]. Hereby, EOAT was added to the mixture of ingredients with canola oil. The fish received the experimental diets until apparent satiation once a day (9 a.m.) for 21 days. Water temperature remained at 24 °C throughout the trial by conditioning ambient air. During the experimental period, pH was around 7.0 and dissolved oxygen was not below 6.5 mg/L. Hardness (26 ± 1.8 mg CaCO₃/L), alkalinity (41.9 ± 0.9 mg CaCO₃/L), nitrite (0.05 ± 0.01 mg/L), total ammonia (0.91 ± 0.62 mg/L), and non-ionized ammonia (0.0049 ± 0.04 mg/L) remained within the recommended levels for silver catfish farming. Tanks were cleaned 30 min after feeding via siphoning to remove waste (remains of food and feces).

After a 21-day feeding trial, the fish were anesthetized with 50 mg/L eugenol [17] for blood collection from caudal vasculature using heparinized syringes (six fish per treatment). Then, 200 µL of *A. hydrophila* solution (ATCC 7966; 2.1×10^9 CFU; 1.7 OD600 nm) were inoculated intramuscularly in the latero-dorsal right side [11]. The fish were maintained under the same experimental conditions as reported above (feed management and water quality). Mortality caused by *A. hydrophila* was observed and recorded daily in each group for 10 additional days. Bacterial re-isolation was made from lesions and kidneys of fish. Morphological and biochemical characteristics were analyzed according to Quinn [18] for bacterial identification and characterization. At the end of the trial (31 days), the remained fish were anesthetized with eugenol and blood was collected as reported above (six fish per treatment).

The hematocrit was assessed by the microhematocrit method. Erythrocyte count was performed in a Neubauer chamber after dilution 1:200 in Natt and Herrick solution. Hemoglobin was determined by the method of cyanomethemoglobin after centrifuging the mixture to remove free cores of erythrocytes. Blood smears were stained with May Grunwald/Giemsa/Wright to determine erythroblast percentage, white blood cell count, and leukocyte differential using an indirect method by counting the total leukocytes number in 2000 erythrocytes in the smears [19,20]. Plasma was separated by centrifugation ($3800 \times g$ for 10 min at 5 °C) and biochemical parameters (alanine aminotransferase – ALT and aspartate aminotransferase - AST) were evaluated using commercial kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brazil). Blood analyses were also performed in healthy fish ($n = 10$) before the feeding trial (basal group). The experimental protocol was approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the UFSM under registration n° 74/2014.

Homogeneity of variances between groups was tested using the Levene test. Comparisons between different groups were made using one-way ANOVA and Duncan's test (Statistica 7.0, StatSoft

Inc., Tulsa, OK, USA). Data were log-transformed when necessary. Fish survival was compared using Kaplan-Meier survival analysis with the Logrank test (Sigma Plot 10.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). The minimum significance level was set at $P \leq 0.05$.

After 21 days of the feeding trial, fish fed an EOAT-supplemented diet showed lower total leukocyte counts and higher total protein values compared to control and basal groups. Lymphocyte and neutrophil counts were significantly lower in fish fed a diet containing EOAT compared to fish of the basal group. No significant difference was found between basal and control groups for all parameters before bacterial challenge (Table 1). After *A. hydrophila* challenge, hematocrit, hemoglobin, erythrocyte, and lymphocyte counts as well as total protein values were lower in the control than in the basal group. Total leukocyte, neutrophil, monocyte, and erythroblast counts as well as AST values were higher in the control than in the basal group. A similar pattern was verified in fish fed a diet containing the lowest EOAT concentration. However, when fish were fed a diet containing 2.0 mL EO/kg, the values for all parameters (except monocytes count) were similar to those in the basal group, showing a possible potential protective effect of EOAT in *A. hydrophila* infected fish (Table 1). Fish survival in the group fed 2.0 mL EO/kg diet was higher than 90% and significantly different from survival in the group infected and fed a control diet (50% survival) (Fig. 1).

Pathogenesis of *A. hydrophila* is multifactorial and depends upon the secretion of numerous extracellular factors. These bacteria can produce more than one hemolytic toxin with virulence properties [21,22]. Thus, these toxins affect erythrocyte parameters in fish and may cause hemolytic anemia [23]. The decreased values of hematological parameters (erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, and total protein) and increased percentage of erythroblasts in the control group and the group that received the lowest EOAT concentration in the diet may be due to a hemolytic process caused by *Aeromonas* infection. In addition, leukocytosis by neutrophilia and absolute monocyte in fish are related to inflammatory processes, often derived from bacterial infection [20,24], which was evident mainly in inoculated fish from the control group and fish fed EOAT at the lowest concentration. However, after bacterial challenge, silver catfish fed diet containing EOAT at 2.0 mL/kg diet showed blood/biochemical responses similar to those in the basal group.

It is recognized that the production of bacterial toxins can be modulated by natural antimicrobials, especially EOs, even at sub-inhibitory concentrations. Essential oils from plants can inhibit biofilm formation or the production of exotoxins such as haemolysins, which cause erythrocytes hemolysis [10,11], thus reducing the bacteria pathogenicity and facilitating the self-healing of fish. In

Table 1
Hematological and biochemical responses of silver catfish fed diets containing different concentrations (mL OE/kg diet) of *Aloisia triphylla* essential oil.

Variable	Basal	Before bacterial challenge			After bacterial challenge		
		0.0 - control	0.25	2.0	0.0 - control	0.25	2.0
Hematocrit (%)	32.6 ± 1.6	30.0 ± 2.1	30.6 ± 1.8	28.6 ± 2.0	14.0 ± 2.0 ^{ab}	15.6 ± 5.0 ^{ab}	29.3 ± 3.1 ^b
Hemoglobin (g/dL)	8.4 ± 0.4	7.5 ± 0.6	7.9 ± 0.4	7.6 ± 0.6	2.9 ± 0.7 ^{ab}	3.1 ± 1.3 ^{ab}	6.8 ± 0.7 ^b
Erythrocytes (10 ⁶ /µL)	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1 ^{ab}	0.8 ± 0.2 ^{ab}	1.9 ± 0.2 ^b
Total leukocytes (10 ³ /µL)	23.8 ± 1.6	20.6 ± 1.2 ^a	14.8 ± 1.6 ^{ab}	13.4 ± 1.1 ^{bc}	70.9 ± 27.5 ^a	47.4 ± 20.2 ^a	37.4 ± 7.5
Lymphocytes (10 ³ /µL)	12.2 ± 1.6	11.3 ± 1.1	7.5 ± 1.7 ^a	7.4 ± 1.7 ^a	6.5 ± 3.2 ^{ab}	4.8 ± 2.2 ^a	13.7 ± 0.2 ^b
Neutrophils (10 ³ /µL)	10.7 ± 1.9	8.1 ± 0.9	6.4 ± 0.9 ^a	5.7 ± 0.9 ^a	59.2 ± 23.8 ^a	39.9 ± 21.4	20.6 ± 2.4
Monocytes (10 ³ /µL)	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.2	5.1 ± 1.1 ^{ab}	2.6 ± 0.5 ^b	3.1 ± 0.1 ^{ca}
Total protein (g/dL)	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2 ^a	5.1 ± 0.3 ^{ab}	5.7 ± 0.3 ^{bc}	2.2 ± 0.6 ^a	2.5 ± 0.8 ^a	4.7 ± 0.3
Erythroblast (%)	0.2 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.09	3.8 ± 1.8 ^{ab}	4.6 ± 1.9 ^{ab}	0.1 ± 0.04 ^b
ALT (U/L)	11.2 ± 2.9	6.0 ± 3.2	9.8 ± 3.3	9.1 ± 3.8	19.0 ± 4.0	19.7 ± 9.6	8.6 ± 3.8
AST (U/L)	87.7 ± 13.4	66.0 ± 20.0	89.0 ± 21.5	53.0 ± 11.0	203.0 ± 74.9 ^{ab}	181.0 ± 74.3 ^{ab}	80.0 ± 28.9 ^b

Data are reported as means ± SEM (standard error) of six fish per treatment. Basal group: values from healthy fish before feeding trial ($n = 10$). Values within the same row with different superscripts indicate a significant difference among treatments for each sampling period (before or after bacterial challenge). (*) indicates a significant difference relative to the basal group (ANOVA and Duncan's test, $P \leq 0.05$). (ALT – alanine aminotransferase, AST – aspartate aminotransferase).

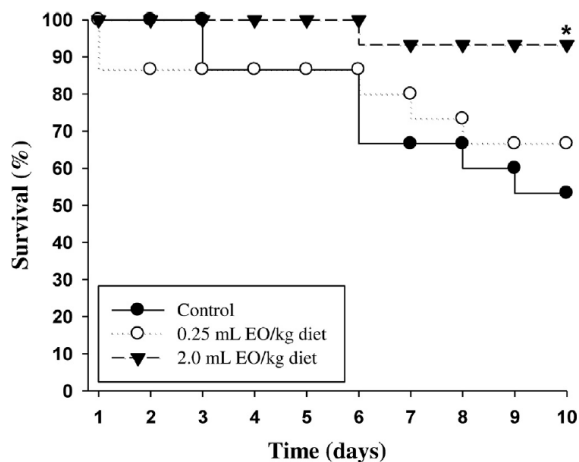


Fig. 1. Survival of silver catfish fed a diet containing different concentrations of *Aloysia triphylla* essential oil (EO) for 21 days following infection with *A. hydrophila* (time of infection evaluated: 10 days). (*) indicates a significant difference relative to the control as determined by Kaplan-Meier survival analysis with Logrank test ($P \leq 0.05$).

addition, plant products such as EOs contain many active compounds known to have immunomodulatory properties in fish. Sometimes they are described as a stimulant based on their effect on some immunological parameters, and at other times, they are described as inhibitors of certain immunological events [7].

The immunological mechanisms of EO are related to their inhibitory and/or stimulatory activity involving cytokines and regulatory transcription factors, and on the expression of pro-inflammatory genes [25]. According to Caldefie-Chez et al. [26] *Melaleuca alternifolia* EO reduced the proliferation of inflammatory cells (human leukocytes) without affecting their capacity to secrete anti-inflammatory cytokines. Therefore, EOAT may act as potential immunosuppressive agent (based on the lymphocytes and neutrophils count before challenge), and/or present anti-inflammatory activity after challenge. In addition, there are substantial studies showing that EOs effects are related not only to cellular innate mechanisms but their action on humoral responses such as proteins of complement system, lysozyme, immunoglobulins and other plasmatic proteins [7,27,28]; which may also explain the increased protein level at 2.0 g/kg group.

In fish culture, EOs have been applied to aquatic organisms via baths or incorporation in the feed [11,15]. However, administering a health promoter through feed would be a practical advantage in the aquaculture management over administering through other routes [29]. Zeppenfeld et al. [15,16] observed antioxidant activity, morphological changes in the gut and enhanced growth of silver catfish fed an EOAT-supplemented diet. Added to the water EOAT showed effective sedative/anesthetic effects for albino and gray silver catfish and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*); it presented antioxidant activity and effectively reduced stress during transport of these two aquatic species [13,14]. The EOAT showed promising results, with stimulation of the antioxidant capacity and prevention of lipoperoxidation as well as suppression of cortisol release in silver catfish after anesthesia [30]. As antimicrobial agent, EOAT showed activity against foodborne pathogens and *Aeromonas* sp. [12,31,32]. Furthermore, the use of EOAT as a sedative in the transport of silver catfish extended freshness and increased shelf life of the refrigerated whole fish; it also delayed lipid oxidation of the fillets during frozen storage [33,34].

As shown in this preliminary study, dietary supplementation

with 2.0 mL EOAT/kg diet seems to help silver catfish maintaining the evaluated hematological/biochemical responses similar to basal values, promoting fish survival. Considering these results and the diversity of uses/activities reported in fish (antibacterial, antioxidant, anti-stress and growth promoter), EOAT seems to be a plant-based product with great potential to be studied and used in aquaculture. Further studies are needed to better understand the possible protective mechanism of EOAT in the pathogenesis of *A. hydrophila*.

Acknowledgements

B. Baldisserotto and M.A Cunha received a research fellowship from CNPq. C. Zeppenfeld received a postdoctoral fellowship from CAPES. A.C. Santos and F.J. Sutili received a PhD fellowship from CAPES. The authors acknowledge support from both funding agencies.

References

- [1] A. Brenes, E. Roura, Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action, *Anim. Feed Sci. Technol.* 158 (2010) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2010.03.007>.
- [2] C. Franz, K. Baser, W. Windisch, Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review, *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 327–340, <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1967>.
- [3] C. Yang, M.A. Chowdhury, Y. Huo, J. Gong, Phytochemicals as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application, *Pathogens* 4 (2015) 137–156, <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens4010137>.
- [4] M. Reverter, N. Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs, P. Sasal, Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives, *Aquaculture* 433 (2014) 50–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>.
- [5] C.-S. Lee, C. Lim, D.M. Gatlin, C.D. Webster, *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, 2015.
- [6] S.B. Chakraborty, P. Horn, C. Hancz, Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture, *Rev. Aquac.* 6 (2014) 1–19, <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12021>.
- [7] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, M.S. Heo, Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish, *Aquaculture* 317 (2011) 1–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>.
- [8] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - a review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [9] E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas, P. Florou-Paneri, Aromatic plants as a source of bioactive compounds, *Agriculture* 2 (2012) 228–243, <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture2030228>.
- [10] F. Nazzaro, F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola, V. De Feo, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals* 6 (2013) 1451–1474, <http://dx.doi.org/10.3390/ph6121451>.
- [11] F.J. Sutili, L.L. Silva, L.T. Gressler, L.T. Gressler, E.K. Battisti, B.M. Heinzmann, et al., Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish, *J. Appl. Microbiol.* 119 (2015) 47–54, <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12812>.
- [12] T.V. Parodi, A.C. Vargas, C. Kremer, É.M.M. Flores, B. Baldisserotto, B.M. Heinzmann, et al., Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56 (2013) 283–292, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000200014>.
- [13] T.V. Parodi, M.A. Cunha, C.G. Heldwein, D.M. de Souza, A.C. Martins, L.O. Garcia, et al., The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae), *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 155 (2012) 462–468, <http://dx.doi.org/10.1111/are.12043>.
- [14] T.V. Parodi, M.A. Cunha, A.G. Becker, C.C. Zeppenfeld, D.I. Martins, G. Koakoski, et al., Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*, *Fish. Physiol. Biochem.* 40 (2014) 323–334, <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9845-z>.
- [15] C.C. Zeppenfeld, D.R. Hernández, J.J. Santinón, B.M. Heinzmann, M.A. Cunha, D. Schmidt, et al., Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Aquacult. Nutr.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12311>.
- [16] C.C. Zeppenfeld, E.M.H. Saccol, T.S. Pês, J. Salbego, G. Koakoski, A.C. Santos, et al., *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* - stress and antioxidant parameters, *Aquacult. Nutr.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12511> (In Press).
- [17] M.A. Cunha, C.C. Zeppenfeld, L.O. Garcia, V.L. Loro, M.B. Fonseca, T. Emanuelli,

- et al., Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet, *Cienc. Rural.* 40 (2010) 2107–2114, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000154>.
- [18] P.J. Quinn, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Vibrio* species, in: P.J. Quinn, M.E. Carter, B.K. Markey, G.R. Carter (Eds.), *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolfe Publishing, London, UK, 1994, pp. 243–253.
- [19] M.A. Thrall, *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, second ed., 2015. Roca, Brasil.
- [20] M.J.T. Razani-Paiva, S.B. Pádua, M. Tavares-Dias, M.I. Egami, *Métodos para análise hematológica de peixes*, first ed., 2013. Eduem, Maringá, Brasil.
- [21] J.M. Pemberton, S.P. Kidd, R. Schmidt, Secreted enzymes of *Aeromonas*, *FEMS Microbiol. Lett.* 152 (1997) 1–10, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00186-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00186-9).
- [22] H.B. Yu, Y.L. Zhang, Y.L. Lau, F. Yao, S. Vilches, S. Merino, et al., Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 4469–4477, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4469-4477.2005>.
- [23] J.M. Janda, S.L. Abbott, The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2010) 35–73, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00039-09>.
- [24] M. Noro, F. Wittwer, *Hematología de Salmonídeos*, first ed., Imprenta América Valdivia, 2012. Chile.
- [25] M.G. Miguel, Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review, *Molecules* 15 (2010) 9252–9287, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15129252>.
- [26] F. Caldefie-Chezet, C. Fusillier, T. Jarde, H. Laroye, M. Damez, M.P. Vasson, et al., Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes, *Phytother. Res.* 20 (2006) 364e370, <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1862>.
- [27] W.M. dos Santos, T.S. de Brito, S.A. Prado, C.G. de Oliveira, A.C. de Paula, D.C. de Melo, et al., Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress, *Fish. Shellfish Immunol.* 54 (2016) 551–555, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.135>.
- [28] F.J. Sutili, A. Velasquez, C.G. Pinheiro, B.M. Heinzmann, D.M. Gatlin III, B. Baldisserotto, Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets, *Fish. Shellfish Immunol.* 56 (2016) 155–161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.008>.
- [29] S.M. Logambal, S. Venkatalakshmi, R.D. Michael, Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters), *Hydrobiologia* 430 (2000) 113–120, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1004029332114>.
- [30] L.T. Gressler, A.P.K. Riffel, T.V. Parodi, E.M.H. Saccol, G. Koakoski, S.T. Costa, et al., Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status, *Aquac. Res.* 45 (2014) 1061–1072, <http://dx.doi.org/10.1111/are.12043>.
- [31] A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Figueira, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Braz. J. Microbiol.* 35 (2004) 275–280, <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>.
- [32] A.P. Daniel, Essential Oil and Infusion of *Aloysia Triphylla*: Effect on Stability of Silver Catfish Flesh (*Rhamdia quelen*) (Thesis), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 2014.
- [33] A.P. Daniel, A.P. Veeck, B. Klein, L.F. Ferreira, M.A. da Cunha, T.V. Parodi, et al., Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice, *J. Food. Sci.* 79 (2014) 1205–1211, <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12463>.
- [34] A.P. Daniel, L.F. Ferreira, B. Klein, A.R. Ruviano, A. Quatrin, T.V. Parodi, et al., Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport, *Cienc. Rural.* 46 (2016) 560–566, <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr2014024>.

2.1.2 Manuscrito 2

O manuscrito intitulado “Essential oil of *Aloysia citriodora* Paláu and citral: sedative and anesthetic efficacy and safety in *Rhamdia quelen* and *Ctenopharyngodon idella*” será submetido a um periódico com Qualis B2, ou maior, no quadriênio 2013–2016 na Ciências Biológicas II.

1 **Original manuscript**

2

3

4 **Essential oil of *Aloysia citriodora* Paláu and citral: sedative and anesthetic efficacy and** 5 **safety in *Rhamdia quelen* and *Ctenopharyngodon idella*.**

6

7

8 Alessandro Casale dos Santos^a, Adriane Erbice Bianchini^a, Guerino Bandeira Junior^a,
9 Quelen Iane Garlet^a, Marisa Teresinha de Bastos Brasil^b, Berta Maria Heinzmann^a,
10 Bernardo Baldisserotto^a, Braulio Otomar Caron^c, Mauro Alves da Cunha^{a,1}.

11

12 ^a Graduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),
13 Santa Maria, RS, Brazil.

14 ^b Graduate Program in Animal Husbandry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),
15 Santa Maria, RS, Brazil.

16 ^c Department of Agronomic and Environmental Sciences, Universidade Federal de
17 Santa Maria (UFSM), Frederico Westphalen, RS, Brazil.

18

19 ¹ Corresponding author: Mauro Alves da Cunha, cunha.mauroalves@gmail.com,
20 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (Tel.: +55 32209382), Prédio 21, Sala
21 5118, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Santa Maria,
22 CEP 97105-900, RS, Brazil.

23

24 ABSTRACT

25

26 **Objective**

27 To verify the efficacy of citral in inducing sedation and anesthesia in silver catfish (*Rhamdia*
28 *quelen*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and, the safety of essential oil (EO) of
29 *Aloysia citriodora* and citral in inducing anesthesia in silver catfish.

30 **Study design**

31 Randomized Experimental study.

32 **Animals**

33 Ninety-two juveniles silver catfish, 72 adults silver catfish and 72 juveniles grass carp were
34 randomly selected.

35 **Methods**

36 Silver catfish and grass carps were exposed to different concentrations of citral, 15–675 $\mu\text{L L}^{-1}$
37 $^{-1}$ and 15–600 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively, during the maximum period of 30 min. After, fishes were
38 removed for recovery, to verify the induction and recovery times. In addition, silver catfish
39 were exposed to EO of *A. citriodora* and citral, at 225 $\mu\text{L L}^{-1}$ for 3.5 min for anesthetic
40 induction. After, silver catfish were transferred to an anesthesia maintenance solution at 50 μL
41 L^{-1} for 10 min, to assess hematological and biochemical parameters 60 min, two and six days
42 after treatment.

43 **Results**

44 Citral induced sedation only from 15, 25 and 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ in both species. Anesthesia without
45 mortality was induced in silver catfish at concentrations of 50 to 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ and, in grass carp
46 at 75 to 450 $\mu\text{L L}^{-1}$. At concentrations of 675 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ mortality were recorded in silver
47 catfish and grass carp, respectively. In addition, the EO of *A. citriodora* and citral were safe in
48 inducing long anesthesia in silver catfish, with mean corpuscular hemoglobin concentration
49 (CHCM) being the only parameter that varies in relation to time and treatments.

50 **Conclusions and clinical relevance**

51 Citral was effective in inducing sedation and anesthesia in both species. In addition, *A.*
52 *citriodora* EO and citral were safe in inducing long anesthesia in silver catfish. Both agents are
53 promising substances for the development of new drugs for fishes.

54

55 Keywords: *Aloysia triphylla*; fish; hematology; biochemical profile; silver catfish; grass carp.

56

57 INTRODUCTION

58

59 The benefits of sedative and anesthetics procedures in aquaculture have been proven
60 (Z AHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012). The interest in sedative and anesthetic
61 procedures for fish is increasing in the contemporary scientific literature. Initially, the focus
62 was on the study of several synthetic drugs such as tricaine methanesulfonate (MS-222),
63 benzocaine, quinaldine, 2-phenoxyethanol and etomidate (SCHOETTGER; JULIN, 1967;
64 GILDERHUS; MARKING, 1987; KAZUŃ; SIWICKI, 2012). Presently, the study of
65 substances of natural origin, such as the essential oils (EOs) of plants and substances isolated
66 from such EOs has been a promising alternative to more traditional products (CUNHA et al.,
67 2010; HELDWEIN et al., 2014; BENOVIĆ et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017; HOSEINI;
68 MIRGHAED; YOUSEFI, 2019).

69 The *Aloysia citriodora* Paláu plant, with synonyms *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton,
70 *Lippia citriodora* Kunth, *Lippia triphylla* (L'Hér.) Kuntze, *Verbena triphylla* L'Hérit., and
71 *Verbena citriodora* Cav., popularly known in Brazil as cidró, in South American Spanish-
72 speaking countries as cedrón, and in English as lemon verbena, among other denominations, is
73 a shrub of the Verbenaceae family which has leaves and flowers rich in EO. The plant has been
74 cultivated and used worldwide as a spice and in folk medicine as a sedative, among other uses
75 (BAHRAMSOLTANI et al., 2018).

76 The EO of *A. citriodora* has proven sedative and anesthetic efficacy in fishes. Several
77 studies place the product as promising in the development of new drugs for the mentioned uses,
78 in fish (GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014, 2020; ZEPPEFELD et al., 2014;
79 SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017). The major component verified for the *A.*
80 *citriodora* EO in these studies has been one terpenoid, the citral (a mixture of α -citral or geranial
81 and β -citral or neral), although the component has not been definitively linked to the related
82 effects.

83 The silver catfish (*Rhamdia quelen*) is widely used in studies on sedation and anesthesia
84 with emphasis in EOs or isolated components of EOs (CUNHA et al., 2010; GRESSLER et al.,
85 2014; HELDWEIN et al., 2014; PARODI et al., 2014; ZEPPEFELD et al., 2014; BENOVIĆ
86 et al., 2015; SANTOS et al., 2017). It is native of South America, suitable for fish farming for
87 human consumption (GOMES et al., 2000). The grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is the
88 most raised species of fish for consumption worldwide (FOOD AND AGRICULTURE
89 ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018), there is a lack of data on sedation and
90 anesthesia procedures for this species, with only one study reporting the effectiveness of

91 etomidate (KAZUN¹; SIWICKI, 2012) and another one regarding the effect of the EO of
92 *Ocimum micranthum* (ZEPPEFELD et al., 2019).

93 The anesthetic effect is a result between the concentration and the exposure time.
94 Sedation is a preliminary state of anesthesia on a continuum (ROSS; ROSS, 2008). According
95 to Marking and Meyer (1985), it is desirable that a fish anesthetic is able to induce anesthesia
96 quickly, with effective immobilization and equally fast anesthetic recovery. Ross and Ross
97 (2008) complement this idea when they state that anesthetic induction must be free of
98 hyperactivity on the part of the animal, when in contact with the anesthetic agent.

99 To be authorized for use, the substance must have proven safety and efficacy
100 (EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2018; UNITED STATES, 1938).
101 United States and Europe are subject to a shortage of drugs for use in fish, which harms the
102 health and welfare of animals. The proposal of new active substances, for the authorization of
103 new sedative and anesthetic drugs aimed at reducing the verified shortage is a current and urgent
104 theme for the development of fish farming worldwide (AMERICAN FISHERIES SOCIETY,
105 2019; CENTER FOR VETERINARY MEDICINE, 2007; FISHMEDPLUS COALITION,
106 2017).

107 This study aims to verify the effectiveness of citral as a sedative and anesthetic agent in
108 silver catfish and grass carp, in addition to verifying the safety of *A. citriodora* EO and citral in
109 maintaining anesthesia in silver catfish. The hypotheses assumed are that citral will be effective
110 in inducing sedation and anesthesia in silver catfish and grass carp, and that the EO and the
111 isolate will be safe for maintaining anesthesia in silver catfish.

112

113 MATERIALS AND METHODS

114

115 *Plant material, EO of A. citriodora and citral*

116

117 *Aloysia citriodora* Paláu was cultivated in the campus of the Universidade Federal de
118 Santa Maria (UFSM) located in the city of Frederico Westphalen (RS, Brazil). Agronomist
119 Renato Aquino Záchia identified the species. A voucher was deposited in the herbarium of the
120 Department of Biology of UFSM (SMDB 16.111). The EO was extracted from leaves of the
121 plant by hydrodistillation with a Clevenger apparatus (3 h) according to European
122 Pharmacopoeia (2007). The *A. citriodora* EO was stored in amber flasks at -20°C. The EO
123 density determined, by weighing, was 0.9.

124 The gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) performed for the identification
125 of components of the *A. citriodora* EO was executed in an Agilent 6890A gas chromatograph
126 coupled with a 5973 mass selective detector using an HP-CHIRAL capillary column (30 m x
127 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness) and the electron ionization mode at 70 eV. Helium was
128 used as the carrier gas in a flow rate of 1.0 mL min^{-1} , with the injector temperature set at 250°C
129 and detector temperature at 280°C. The oven temperature was kept at 40°C for 4 min, then
130 raised to 240°C at a rate of 4°C min^{-1} . Sample solutions of 1 μL (2:1000 in hexane, v/v) were
131 injected in the splitless mode. Kovats retention indices were calculated using a homologous
132 series of C8-C40 n-alkanes injected under the same conditions as the samples. The constituents
133 were identified by mass spectra and Kovats retention index comparison with data from the Mass
134 Spectral Library of the National Institute of Standards and Technology (NIST/EPA/NIH, 2008)
135 and from the literature (ADAMS, 2009). The relative percentage of compounds was estimated
136 by under peak area integration obtained from the chromatogram.

137 Citral was purchased from Sigma-Aldrich (Brazil) (natural, $\geq 96\%$, Aldrich).

138

139 **Animals**

140

141 Juveniles and adults silver catfish and juveniles grass carp (males and females) that were
142 apparently healthy (i.e., no external signs of lesions) were bought from a local fish farm and
143 transported to the Fish Physiology Laboratory (*LAFIPE*) at UFSM for an acclimation of five
144 days. Fishes were stored in water tanks with a capacity of 250 L, under continuous aeration and,
145 biological and mechanical filtration. The photoperiod was 12/12 h. The fishes were fed to
146 satiety once a day. The experiments were performed with the animals fasted for 24 h.

147 The water quality parameters were checked daily: dissolved oxygen at 8.67 ± 0.55 mg
148 L^{-1} , pH of 7.4 ± 0.2 , and temperature of $22.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$. In order to maintain total ammonia and/or
149 nitrite levels respectively around 0.9 ± 0.7 mg L^{-1} and 0.06 ± 0.02 mg L^{-1} , respectively, partial
150 water exchanges were sometimes required. A YSI oxygen meter (Model Y5512; YSI Inc., OH,
151 USA), DMPH-2 pH meter (Digimed Analytical Instrumentation, MS, Brazil), mercury
152 thermometers, and commercial kits for total ammonia and nitrite (NO_2^-) (LabcomTest®,
153 Camboriú, SC, Brazil) were used to measure the water parameters.

154 The Animal Use Ethics Committee of UFSM (process no. 074/2014) approved this
155 study. The procedures were performed in accordance with the principles of reduction,
156 refinement and replacement of animal experimentation.

157

158 Efficacy verification procedure

159

160 Sedation and anesthesia were assessed employing a protocol adapted from Small (2003).
161 The stages I and II correspond to a progressive state of sedation of the animals. The stage I
162 consists in decrease in swimming activity and/or environmental responsiveness. In stage II, fish
163 stays at the bottom of the aquarium or presents partial loss of balance and/or erratic swimming.
164 The stage III is the anesthesia stage, with no movement and no response to external stimuli.
165 The stage IV is reached with respiratory failure and fish death. Sensitivity to external stimuli
166 was verified from light pressure on the caudal peduncle of fishes.

167 Eighty-eight silver catfish juveniles (8.0 ± 1.7 cm, 4.5 ± 1.3 g, $n = 8$ per treatment) and
168 72 grass carp (8.4 ± 1.8 cm, 10 ± 2.5 g, $n = 8$ per treatment), randomly chosen, were exposed
169 to different concentrations of citral. For silver catfish 15, 25, 40, 50, 75, 150, 225, 300, 450,
170 600 and $675 \mu\text{L L}^{-1}$ and, 15, 25, 40, 75, 150, 225, 300, 450 and $600 \mu\text{L L}^{-1}$ for grass-carp. Citral
171 was previously dissolved (95% ethanol, 1:10). For control, two ethanol groups ($n = 8$ per
172 treatment) were transferred to aquaria that contained only ethanol at a concentration that was
173 equivalent to the dilution used for 675 and $600 \mu\text{L L}^{-1}$ of citral for silver catfish and grass carp,
174 respectively.

175 Sedation and anesthesia induction times, in addition to the anesthesia recovery times
176 were used in the elaboration of concentration-response curves. The fishes were exposed one by
177 one to different concentrations of citral in 1 L aquaria under continuous aeration. The induction
178 time to different stages of anesthesia was evaluated for up to 30 min. Each fish was used only
179 once. After recovery, the fishes were submitted to biometry. Finally, the fishes were placed in
180 other aquaria (fish of same species submitted as the same treatments in a same 30 L aquaria),
181 in conditions similar to the original ones. Animal survival was assessed for 48 h after the
182 procedure.

183 In this study, the gold pattern in anesthetic efficacy, for fast induction and recovery
184 times, will be times below 3 min (180 s) and 5 min (300 s), respectively (MARKING; MEYER,
185 1985). The concentration considered ideal of citral added to the water, for fast induction and
186 recovery times in jundiá and grass carp, was the minimum effective concentration capable of
187 inducing the highest level of observed effect, this combined with the shortest recovery time.

188

189

190

191

192 Safety verification procedure

193

194 The verification of the anesthetic safety of the EO of *A. citriodora* and of the citral in
195 silver catfish was performed in a longer procedure, in relation to the possibilities of the pattern
196 of rapid induction and recovery times verified for the citral. The concentration chosen for the
197 induction of anesthesia by citral was that immediately below, in relation to the concentration
198 established as ideal for rapid induction and recovery times, in the efficacy study. In addition,
199 an anesthetic maintenance solution was developed from the lowest concentration of citral
200 capable of inducing anesthesia, within the maximum proposed period of 30 min. The anesthetic
201 induction period was adapted to the new concentration used and, the animals' persistence time
202 in the maintenance solution was set at 10 min, the handling period most demanded by fish
203 workers, according to Marking and Mayer (1985). The concentration and procedures verified
204 for the citral were repeated for the EO of *A. citriodora*.

205 Seventy-two silver catfish adults (31.02 ± 3.11 cm, 138.71 ± 34.45 g), randomly chosen,
206 were divided equally into four groups (18 animals each). Fish were exposed to different
207 treatments: water control group (WCG), ethanol control group (ECG), citral group (CG), and
208 *Aloysia* group (AG). The fish were individually placed in 10 L aquaria and exposed to anesthetic
209 solutions (CG or AG at $225 \mu\text{L L}^{-1}$), or other treatments (WCG or ECG) for 3.5 min (210 s) to
210 induce anesthesia according to Small (2003). The ethanol group was made from the amount of
211 ethanol equivalent to the dilution used for $225 \mu\text{L L}^{-1}$ of anesthetic agents. Afterward, the fish
212 were transferred to another aquarium, where they remained for 10 min (600 s) in anesthetic
213 maintenance solutions of *A. citriodora* EO or citral of the $50 \mu\text{L L}^{-1}$, or other treatments.

214 Sensitivity to external stimuli was verified when the fish were passed from induction
215 solutions to anesthetic maintenance solutions. After the maintenance period, the animals were
216 submitted to biometrics. After biometrics, the fish were placed in aquaria with water only, for
217 recovery. After recovery, all fish returned to their original tanks.

218 The recovery times were not counted in detail because it was not the objective of this
219 experiment, but the maximum period of 10 min for complete recovery of each fish was
220 established as a limitation for the procedure. In a pilot with four juvenile silver catfish, it was
221 verified that the anesthetic recovery times of the long procedure were around 5 min.

222

223

224

225

226 Blood collection

227

228 Blood samples were collected on days 0 (60 min after anesthetic recovery) (T1), 2 (two
229 days after recovery) (T2), and 6 (six days after recovery) (T3). For this purpose, six fish from
230 each group (per day of collection) were punctured in the caudal vessel with heparinized needles
231 and syringes for hematological and biochemical determinations. A small aliquot of blood was
232 collected without adding anticoagulant to the syringes so to determine some parameters in the
233 serum. After blood collection, the animals were placed in other tanks (250 L) in conditions
234 similar to the original ones, for the observation of their survival and clinical situation until the
235 end of the experiment (day 8).

236

237 Hematological parameters

238

239 Hematological parameters were determined according to Ranzani-Paiva et al. (2013).
240 The hematocrit (Ht) was assessed by micro-centrifugation at 13680 x g for 5 min. Erythrocyte
241 (RBC) count was performed in a Neubauer chamber after dilution 1:200 in Natt and Herrick
242 solution. Hemoglobin (Hb) was determined by the method of cyanomethemoglobin after
243 centrifuging the mixture (2318 x g for 10 min) to remove free cores of RBC (Blood smears
244 were stained with rapid hematology stain Diff-Quik) to determine white blood cell count, and
245 leukocyte differential using an indirect method by counting the total leukocytes number in 2000
246 RBC in the smears.

247 Total plasmatic protein (TPP) was determined by refractometry. The mean corpuscular
248 volume (MCV) and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated
249 through the formula.

250

251 Biochemical parameters

252

253 Serum and plasma were separated by centrifugation at 2318 x g for 10 min. Biochemical
254 parameters were determined through commercial kits and a BIO-200® semiautomatic
255 spectrophotometer (Bioplus, Barueri, SP, Brazil). The parameters were: alanine
256 aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP),
257 gamma-glutamyltransferase (GGT), urea (UR), creatinine (CRE), uric acid (UA), glucose
258 (GLU), cholesterol (CHO), triglycerides (TRI), lactate (LAC), total protein (TP), albumin
259 (ALB) (from Bioclin®, Belo Horizonte, MG, Brazil), chloride (Cl⁻), and sodium (Na⁺) (from

260 In-Vitro Diagnóstica[®], Belo Horizonte, MG, Brazil). Globulins were determined by the
261 difference between PT and ALB, while TRI, TP, ALB, Cl⁻, and Na⁺ were determined in serum.

262

263 **Statistical analysis**

264

265 All data are expressed as mean \pm standard error (SE). Data related to the verification of
266 the sedative and anesthetic efficacy of citral were submitted to the Levene test with conversions
267 of the data to logarithms when necessary, followed by the application of one-way ANOVA and
268 Tukey's test. Data related to the verification of the safety of anesthetic procedures of *A.*
269 *citriodora* EO and citral were submitted to the Levene test with conversions of the data to
270 logarithms when necessary, followed by the application of two-way ANOVA and Tukey's test.
271 All statistical analysis were performed using Statistica[®] 7.0. The minimum level of significance
272 was of $p < 0.05$.

273

274 **RESULTS**

275

276 ***Chemical characterization of A. citriodora EO***

277

278 The main constituents of *A. citriodora* EO were citral (α -citral or geranial 17.71% and
279 β -citral or neral 14.85%), caryophyllene oxide-trans (9.91%), and limonene (L-limonene 8.31
280 and D-limonene 7.71%) (Table 1).

281

282 **Efficacy of citral**

283

284 Citral added to water induced sedation (stages I and II), without inducing anesthesia
285 (stage III) within the proposed period of 30 min, at concentrations of 15, 25 and 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ in
286 silver catfish e grass carp. At concentrations of 15 and 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ both species reached stage I
287 only, with significantly longer time ($p < 0.05$) in the carp, at the lowest concentration
288 mentioned. At a concentration of 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ both species reached stage II, with carp reaching
289 stage I significantly earlier. Anesthetic recovery times were not recorded for concentrations that
290 did not induce stage III, within the maximum period proposed (Fig. 1).

291 The anesthetic effect of citral demonstrated a concentration-dependent pattern in silver
292 catfish and grass carp, with faster induction and slower recovery following the increase in the

293 concentrations used. Anesthesia without mortality was induced in silver catfish at
294 concentrations of 50 to 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ and in carp at 75 to 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 2A and 2B).

295 The most suitable concentrations for rapid induction and recovery from anesthesia were
296 the concentrations of 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ for silver catfish and grass carp. For the silver catfish it was
297 possible to induce stage III with recovery time, described as mean \pm standard error, below 3
298 min (180 s) (148.92 ± 10.88 s) and around 5 min (300 s) (286.76 ± 33.45 s), respectively. For
299 grass carp stage III was reached below 3 min (112.33 ± 11.42 s), with recovery above 10 min
300 (600 s) (722.33 ± 74.42 s).

301 In relation to silver catfish, citral induced significantly faster stage I and stages I to III
302 in grass carp, at concentrations of 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectively. In addition,
303 anesthetic recovery times were significantly longer in carp, at concentrations of 150 to 300 μL
304 L^{-1} (Fig. 3).

305 The fishes passing through sedative and anesthetic procedures showed little
306 hyperactivity due to exposure to citral solutions. Ethanol alone did not induce sedation or
307 anesthesia in silver catfish or grass carp.

308

309 Mortality of efficacy study

310

311 At concentrations of 675 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$, mortality rates of 25% (2 in 8) and 12.5% (1 in 8)
312 were recorded in silver catfish and grass carp, respectively. Regarding the fishes that died
313 during the procedures, after the induction of stage III and immediate passage of the animals
314 from the anesthetic solution to untreated water for recovery, they evolved, without reversion,
315 to respiratory failure.

316

317 **Safety of *A. citriodora* EO and citral**

318

319 The MCHC of the WCG was significantly higher at days 2 (T2) and 6 (T3). This
320 parameter was also significantly higher in fish exposed to CG and AG at day 0 (T1) than that
321 of fish from the WCG group, but equal to the ECG group (Table 2).

322 There was no significant difference among groups at different times in TPP (Table 2),
323 leukogram (Table 3), and biochemical parameters (Tables 4, 5 and 6).

324

325

326

327 Mortality of safety study

328

329 There was no mortality in any group during the observation period, eight days after the
330 anesthetic procedure.

331

332 **Discussion**

333

334 **The composition of plant EO and the effects of *A. citriodora* EO and citral**

335

336 The EOs of plants effective in inducing sedation and anesthesia in fish are mixtures of
337 several substances. The effects induced in animal organisms are often linked to the most
338 abundant components present, in addition to being the product of interaction between
339 components (HELDWEIN et al., 2014; BENOVIĆ et al., 2015; PARODI et al., 2020).
340 According to HELDWEIN et al., 2014, the S-(+)-Linalool isolated from the EO of *Lippia alba*,
341 the most abundant component with 59.66% of the total, although it was able to induce
342 anesthesia in silver catfish, was unable to induce the same level of effect verified for the EO in
343 crude state. As for Benović et al. (2015), although several of the most abundant components in
344 the EO of *Aloysia gratissima* have demonstrated sedative and anesthetic properties in silver
345 catfish, only (+)-Spathulenol was effective in inducing sedation and anesthesia without
346 undesirable side effects. It is worth considering that only 2.71% of the EO was composed by
347 (+)-Spathulenol.

348 Although citral has been found to be the most abundant component in various samples
349 of the EO of *A. citriodora*, the EO of *Cymbopogon flexuosus* and the EO of *L. alba* (citral
350 chemotype), which were effective in inducing sedation and/or anesthesia in fish, the link
351 between the monoterpene and the verified effects did not exist. Thus, the sedative and anesthetic
352 efficacy of citral was demonstrated for the first time in fishes. In addition, citral was able to
353 induce sedation and anesthesia without demonstrating undesirable side effects in fish, as
354 demonstrated by Gressler et al. (2014), Parodi et al. (2014), Zeppenfeld et al. (2014), Santos et
355 al. (2017), Teixeira et al. (2017) and Souza et al. (2018) for the three EOs described previously.

356

357 **Efficacy of citral and rapid induction and recovery times from anesthesia**

358

359 The sedation and anesthesia induced by citral presented a concentration-dependent
360 pattern in silver catfish and grass carp, as observed for the EO of *A. citriodora* and *C. flexuosus*

361 in silver catfish (PARODI et al., 2014; SANTOS et al., 2017) and Nile tilapia (*Oreochromis*
362 *niloticus*) (TEIXEIRA et al., 2017). This demonstrates the similarity of the effects induced by
363 the EO in crude state compared to its major component used alone.

364 MS 222 is one of the most widespread substances authorized to be used as a sedative
365 and anesthetic in fish raised for consumption worldwide (SANTOS; CUNHA, 2021). MS 222
366 is also one of the most studied anesthetics for poikilotherm organisms, especially a wide variety
367 of fish species (PŘÍBORSKÝ; VELÍŠEK, 2018). Studies based on this anesthetic were
368 responsible, in large part, for the definition of the pattern for rapid induction (in less than 3 min)
369 with rapid recovery (in less than 5 min), proposed by Marking and Meyer (1985). At the same
370 time, these proposed time limits guide several studies on the effectiveness of new sedative and
371 anesthetic substances for fish (ROSS; ROSS, 2008; TEIXEIRA et al., 2017; HOSEINI;
372 MIRGHAED; YOUSEFI, 2019). Rapid anesthesia is ideal during the handling of fish for
373 spawning, fin clipping, marking, measuring, some surgical operations like vaccination and
374 immobilizing specimens for various physiological investigations (SCHOETTGER; JULIN,
375 1967; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008).

376 In present study, four levels of effect on induction of stage III have been demonstrated,
377 with no mortality, in silver catfish and grass carp. The times recorded for 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ did not
378 differ significantly from the more concentrated treatments proposed for both species,
379 demonstrating a plateau, where the induction time did not decrease significantly with the
380 increase in the concentrations of citral used. Although the maximum effect on stage III
381 induction has been verified for the concentration of 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ in grass carp, induction time in
382 about 3 min was possible from the concentration of 225 $\mu\text{L L}^{-1}$. Two different levels of
383 anesthetic recovery times were verified for silver catfish, from 50 to 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ and for the
384 concentrations of 450 and 600 $\mu\text{L L}^{-1}$. Three different levels of anesthetic recovery were
385 verified for grass carp, related to the concentrations of 75 to 225 $\mu\text{L L}^{-1}$, 225 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$,
386 and 300 and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$.

387 Although the anesthetic recovery times verified for silver catfish and grass carp were
388 around and longer than those recommended by Marking and Meyer (1985), respectively, in
389 both species the anesthetic induction time was adequate to the recommended pattern. In
390 addition, mortality was only found at concentrations much higher than the concentrations
391 determined to be effective in silver catfish and grass carp.

392

393

394

395 The safety of citral in inducing and maintaining anesthesia

396

397 The toxicity induced by anesthetic procedures in fish varies according to the
398 characteristics of the active substances used, the concentrations used and the time of exposure
399 to the substances. The toxicity to fish increases with the increase of the concentration used and
400 with the increase of duration of exposure (MARKING, 1967; MARKING; MEYER, 1985;
401 ROSS; ROSS, 2008).

402 The type of anesthesia varies according to the procedure to be performed and, the skills
403 or intention of the fish farm worker who performs the procedures with the animals. For carrying
404 out procedures such as tagging, marking, surgical operations, or even longer spawning
405 procedures, long periods of handling animals may be necessary. Many workers need to keep
406 anesthetized fish in the anesthetic solution to facilitate handling and periods of anesthetic
407 maintenance ranging from 5 to 10 min (300 to 600 s) are necessary for many procedures. In this
408 case, the pattern of rapid induction and recovery is not suited to the needs of the procedure to
409 be performed, as it is intended to perform equally rapid procedures (SCHOETTGER; JULIN,
410 1967; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008).

411 The induction of long times of anesthesia without causing toxicity to the animals must
412 be made with lower concentrations of anesthetic than those of rapid procedures. It increases the
413 time required for induction of anesthesia, but prolongs the time of anesthesia without causing
414 toxicity. The use of even lower concentrations, close to the concentrations required for sedation
415 only, as maintenance solutions, are also mentioned as an alternative, after induction
416 (MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008). This was the logic used in the idealization
417 of the long procedure performed in the present study on toxicity.

418 Hematological and biochemical profiles are widely used to assess the safety of
419 anesthetics procedures in fish (VELÍŠEK et al., 2006, 2007; KAZUŇ; SIWICKI, 2012;
420 KŘIŠT'AN et al., 2012; WITESKA; DUDYK; JARKIEWICZ, 2015). In the present study, the
421 fish MCHC varied significantly in relation to time and the different treatments applied, with
422 higher values at days 2 (T2) and 6 (T3) within WCG and higher in CG and AG, in relation to
423 WCG, only at day 0 (T1).

424 Variations of MCHC were verified after the realization of anesthetic procedures induced
425 by different substances in different species of fish. In relation to the control animals,
426 significantly lower MCHC values were verified in European catfish (*Silurus glanis*) submitted
427 to anesthesia by clove oil, immediately and one day after the procedure (VELÍŠEK et al., 2006).
428 Witeska, Dudyk and Jarkiewicz (2015) verified the same in common carps (*Cyprinus carpio*)

429 anesthetized with 2-phenoxyethanol and etomidate seven days after the procedures. In contrast,
430 Velíšek et al. (2007) and Křišť'an et al. (2012) related increases in MCHC in pikeperch (*Sander*
431 *lucioperca*) 10 min and 24 h after anesthesia with 2-phenoxyethanol and etomidate, and in
432 European catfish 24 h after the procedures with 2-phenoxyethanol.

433 Unlike what occurs for mammals, adult fish RBC maintain the nucleus in the
434 bloodstream and mild to moderate anisocytosis and polychromasia are normal in several
435 species. Immature RBC are smaller, have larger nuclei and less abundant cytoplasm, when
436 compared to more differentiated cells. These cells have active metabolism, producing Hb in the
437 bloodstream (THRALL, 2007). Witeska, Dudyk and Jarkiewicz (2015) theorized that MCHC
438 can be reduced in cases of damage to RBC (anesthetic toxicity), whereas Trall (2007) postulated
439 that stress induces the release of catecholamines that cause hemoconcentration and the
440 consequent indirect decrease in calculated MCHC due to the increase in the Ht value. Further
441 studies that aim to understand the kinetics of Hb in the fish's body are necessary to explain the
442 antagonist patterns.

443 According to the verified data, the two hypotheses assumed were confirmed. Citral was
444 effective in inducing sedation and anesthesia in silver catfish and grass carp, with a
445 concentration-response relationship and, under the proposed conditions, *A. citriodora* EO and
446 citral were safe in inducing and maintaining anesthesia in silver catfish. Therefore, the *A.*
447 *citriodora* EO and citral are promising active substances for the development of new veterinary
448 drugs for use in fish.

449

450 **Conflict of interest statement**

451

452 The authors declare that there are no conflicts of interest.

453

454 **Acknowledgments**

455

456 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
457 Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. In part by the Conselho Nacional de
458 Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (CNPq). The authors also thank
459 agronomist Renato Aquino Záchia for identifying the plant.

460

461

462

463 REFERENCES

- 464
465 ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass**
466 **Spectroscopy**. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2009.
467
- 468 AMERICAN FISHERIES SOCIETY. **Guide to using drugs, biologics, and other chemicals**
469 **in aquaculture**: a comprehensive introduction to the legal and judicious use of regulated
470 products in aquaculture and resource for fish culturists and fish health managers. Bethesda:
471 AFS, 2019.
472
- 473 BAHRAMSOLTANI, R.; ROSTAMIASRABADI, P.; SHAHPURI, Z.; MARQUES, A.M.;
474 RAHIMI, R.; FARZAEI, M.H. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): a review of
475 phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 34–51, 2018.
476 DOI 10.1016/j.jep.2018.04.021
477
- 478 BENOVIĆ, S.C.; SILVA, L.L.; SALBEGO, J.; LORO, V.L.; MALLMANN, C.A.;
479 BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity and bio-
480 guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver
481 catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1675–
482 1689, 2015. DOI 10.1590/0001-3765201520140223
483
- 484 CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. United States Department of Health and Human
485 Services (USDA). **Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish**:
486 guidance for industry, n. 150. CVM, 2007.
487
- 488 CUNHA, M.A.; BARROS, F.M.C.; GARCIA, L.O.; VEECK, A.P.L.; HEINZMANN, B.M.;
489 LORO, V.L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new
490 anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 403–406, 2010
491 DOI 10.1016/j.aquaculture.2010.06.014
492
- 493 EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. **Regulation 2019/6/EU of the**
494 **European Parliament and of the Council of 11 December 2018**: on veterinary medicinal
495 products and repealing Directive 2001/82/EC. Official Journal 4, 7.1.2019, p. 43–167, 2018.
496
- 497 EUROPEAN PHARMACOPOEIA. European Directorate for the Quality of Medicines.
498 Strassbourg, 2007.
499
- 500 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. United
501 Nations (ONU). **The state of world fisheries and aquaculture**: meeting the sustainable
502 development goals. Rome: FAO, 2018.
503
- 504 FISHMEDPLUS COALITION. Federation of Veterinarians of Europe. **Fish diseases lacking**
505 **treatment**: final gap analysis outcome. Brussels, 2017.
506
- 507 GILDERHUS, P.A.; MARKING, L.L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on
508 rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 7, n. 2, p. 288–292,
509 1987.
510

- 511 GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. *Biologia do*
512 *jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185,
513 2000. DOI 10.1590/S0103-84782000000100029
- 514
- 515 GRESSLER, L.T.; RIFFEL, A.P.K.; PARODI, T.V.; SACCOL, E.M.H.; KOAKOSKI, G.;
516 COSTA, S.T.; PAVANATO, M.A.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.; SCHMIDT, D.;
517 LLESUY, S.F.; BARCELLOS, L.J.G.; BALDISSEROTTO, B. Silver catfish *Rhamdia quelen*
518 immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine
519 methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v.
520 45, n. 6, p. 1061–1072, 2014. DOI 10.1111/are.12043
- 521
- 522 HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; GAI, E.Z.; ROMAN, C.; PARODI, T.V.; BÜRGER, M.E.;
523 BALDISSEROTTO, B.; FLORES, É.M.M.; HEINZMANN, B.M. S-(+)-linalool from *Lippia*
524 *alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and**
525 **Analgesia**, v. 41, p. 621–629, 2014. DOI 10.1111/vaa.12146
- 526
- 527 HOSEINI, S.M.; MIRGHAED, A.T.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in
528 aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n.3, p. 550–564, 2019. DOI 10.1111/raq.12245
- 529
- 530 KAZUŃ, K.; SIWICKI, A.K. Propiscin: a safe new anaesthetic for fish. **Archives of Polish**
531 **Fisheries**, v. 20, p. 173–177, 2012. DOI 10.2478/v10086-012-0021-3
- 532
- 533 KŘIŠT'AN, J.; STARÁ, A.; TUREK, J.; POLICAR, T.; VELÍŠEK, J. Comparison of the
534 effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch
535 (*Sander lucioperca* L.). **Neuroendocrinology Letters**, v. 33, n. 3, p. 66–71, 2012.
- 536
- 537 MARKING, L.L. Toxicity of MS-222 to selected fishes. **Investigations in Fish Control**, n. 12,
538 p. 1–10, 1967.
- 539
- 540 MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10,
541 n. 6, p. 2–5, 1985. DOI 10.1577/1548-8446(1985)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2
- 542
- 543 NIST/EPA/NIH. **Mass spectral library and search/analysis programs**. Gaithersburg: John
544 Wiley & Sons, 2008.
- 545
- 546 PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.; BECKER, A.G.; ZEPPEFELD, C.C.; MARTINS, D.I.;
547 KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L.J.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.
548 Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress
549 during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology**
550 **and Biochemistry**, v. 40, p. 323–334, 2014. DOI 10.1007/s10695-013-9845-z
- 551
- 552 PARODI, T.V.; GRESSLER, L.T.; SILVA, L.L.; BECKER, A.G.; SCHMIDT, D.; CARON,
553 B.O.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Chemical composition of the essential oil
554 of *Aloysia triphylla* under seasonal influence and its anaesthetic activity in fish. **Aquaculture**
555 **Research**, v. 51, n. 6, p. 2515–2524, 2020. DOI 10.1111/are.14594
- 556
- 557 PŘÍBORSKÝ, J; VELÍŠEK, J, A review of three commonly used fish anesthetics. **Reviews in**
558 **Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n.4, p. 417–442, 2018.
- 559

- 560 RANZANI-PAIVA, M.J.T; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos**
561 **para análise hematológica de peixes**. Maringá: Eduem, 2013.
562
- 563 ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd ed.
564 Oxford: Blackwell Science, 2008.
565
- 566 SANTOS, A.C.; BANDEIRA JUNIOR, G.; ZAGO, D.C.; ZEPPENFELD, C.C.; SILVA, D.T.;
567 HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M.A. Anesthesia and anesthetic
568 action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver
569 catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, n. 1, p. 106–113,
570 2017. DOI 10.1111/vaa.12386
571
- 572 SANTOS, A.C.; CUNHA, M.A. International legislation on drugs and biological products used
573 in the sanitary management of aquatic animals. *In*: KIBENGE, F.S.B.; BALDISSEROTTO, B.;
574 CHONG, R.S. **Aquaculture Pharmacology**. London: Academic Press, 2021. p. 348–390. DOI
575 10.1016/B978-0-12-821339-1.00011-8
576
- 577 SCHOETTGER, R.A.; JULIN, A.M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids.
578 **Investigations in Fish Control**, n. 13, p. 1–15, 1967.
579
- 580 SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses
581 to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus*
582 *punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, n. 1– 4, p. 177–185, 2003. DOI 10.1016/S0044-
583 8486(02)00302-2
584
- 585 SOUZA, C.F.; BIANCHINI, A.E.; SILVA, E.G.; MOURÃO, R.H.V.; SILVA, L.V.F.;
586 SCHMIDT, D.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Citral and linalool chemotypes
587 of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side
588 effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and**
589 **Biochemistry**, v. 44, p. 21–34, 2018. DOI 10.1007/s10695-017-0410-z
590
- 591 TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN,
592 B.M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia:
593 anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48,
594 n. 7, p. 3383–3392, 2017. DOI 10.1111/are.13165
595
- 596 THRALL, M.A. Hematologia de peixes. *In*: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**.
597 São Paulo: Roca, 2007. p. 265–276.
598
- 599 UNITED STATES. **Federal Food, Drug and Cosmetic Act**. United States Code, Title 21
600 (Food and Drugs), Chapter 9 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act), 1938 Disponível em:
601 <https://uscode.house.gov/browse/prelim@title21/chapter9&edition=prelim>. Acessado em
602 13/01/2020.
603
- 604 VELÍŠĚK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L. Effects of
605 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheat-fish (*Silurus glanis* L.). **Veterinární Medicína**, v. 52,
606 n. 3, p. 103–110, 2007. DOI 10.17221/2011-VETMED
607

- 608 VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L.;
609 ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta**
610 **Veterinaria Brunensis**, v. 75, p. 99–106, 2006. DOI 10.2754/avb200675010099
611
- 612 WITESKA, M.; DUDYK, J.; JARKIEWICZ, N. Haematological effects of 2-phenoxyethanol
613 and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 42, n.
614 5, p. 537–546, 2015. DOI 10.1111/vaa.12242
615
- 616 ZAHL, I.H.; SAMUELSEN, O; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for
617 welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 201–218, 2012. . DOI 10.1007/s10695-
618 011-9565-1
619
- 620 ZEPPENFELD, C.C.; BRASIL, M.T.B.; CAVALCANTE, G.; SILVA, L.V.F.; MOURÃO,
621 R.H.; CUNHA, M.A.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction of juveniles of *Rhamdia*
622 *quelen* and *Ctenopharyngodon idella* with *Ocimum micranthum* essential oil. **Ciência Rural**,
623 v. 49, e20180218, 2019. DOI 10.1590/0103-8478cr20180218
624
- 625 ZEPPENFELD, C.C.; TONI, C.; BECKER, A.G.; MIRON, D.S.; PARODI, T.V.;
626 HEINZMANN, B.M.; BARCELLOS, L.J.G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; LORO, V.L.;
627 CUNHA, M.A.; BALDISSEROTTO, B. Physiological and biochemical responses of silver
628 catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit)
629 Britton. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 101–107, 2014. DOI 10.1016/j.aquaculture.2013.10.013
630

631 **Table 1**632 Chemical composition of *Aloysia citriodora* Paláu EO.

Peak	RT	Compound	KIC	KIL	Ref.	%
1	17.50	L-Limonene	1031	1028	Nist	8.31
2	17.59	D-Limonene	1032	1035	Nist	7.71
3	17.68	E-3-Octen-2-one	1034	1036	Nist	3.34
4	22.66	S-Linalool	1091	1100	Nist	0.47
5	22.72	R-Linalool	1098	1105	Nist	0.43
6	23.30	Limonene oxide, cis-	1140	1132	Nist	0.93
7	23.40	Limonene oxide, trans-	1143	1139	Nist	0.33
8	23.48	NI	1175	–	Nist/Adams	0.25
9	23.66	NI	1176	–	Nist/Adams	0.32
10	23.74	NI	1196	–	Nist/Adams	0.19
11	24.27	NI	1207	–	Nist/Adams	0.15
12	24.32	NI	1210	–	Nist/Adams	0.18
13	27.15	NI	1238	–	Nist/Adams	0.30
14	27.64	β -Citral (Neral)	1242	1244	Nist	14.85
15	27.75	Nerol	1246	1254	Nist	2.49
16	28.73	Geraniol	1250	1258	Nist	2.91
17	28.82	α -Citral (Geranial)	1251	1250	Nist	17.71
18	29.01	NI	1423	–	Nist/Adams	0.40
19	30.43	Nerol acetate	1339	1342	Nist	0.81
20	30.75	NI	1342	–	Nist/Adams	0.33
21	30.86	NI	1350	–	Nist/Adams	0.60
22	31.29	Geraniol acetate	1357	1352	Nist	3.67
23	32.24	NI	1379	–	Nist/Adams	1.82
24	32.77	NI	1388	–	Nist/Adams	1.20
25	33.54	α -Curcumene	1464	1473	Nist	5.10
26	33.68	NI	1469	–	Nist/Adams	1.84
27	34.53	Nerolic acid	1508	1499	Nist	2.00
28	34.65	Guaiene	1513	1504	Nist	0.47
29	36.81	(+)-Nerolidol	1544	1535	Nist	0.80
30	37.96	Caryophyllene oxide-cis	1573	1576	Nist	2.71
31	38.07	Caryophyllene oxide-trans	1577	1576	Nist	9.91
32	38.24	NI	1582	–	Nist/Adams	0.39
33	38.43	(-)-Spathulenol	1584	1578	Nist	4.53
34	40.09	tau.-Cadinol	1619	1625	Nist	2.56
Total identified						94.24

633 Where RT= retention time; KIC= Calculated Kovats Index; KIL= Literature Kovats Index
634 (NIST, 2008 (Mass spectral library); Adams, 2009); NI= non identified compound.

635 **Table 2**

636 Erythrogram and total plasma protein of silver catfish (*Rhamdia quelen*) on days 0 (T1), 2
 637 (T2) and 6 (T3) after exposure to *Aloysia citriodora* Paláu EO and citral.

		HT	RBC	HB	MCV	MCHC	TPP
WCG	T ₁	29.60 ±	1.54 ±	5.09 ±	190.60 ±	16.67 ±	4.88 ±
		3.85 ^a	0.17 ^a	0.88 ^a	5.12 ^a	1.59 ^a	0.32 ^a
	T ₂	26.75 ±	1.42 ±	5.90 ±	188.46 ±	22.06 ±	5.15 ±
		2.13 ^a	0.10 ^a	0.57 ^a	9.33 ^a	1.05 ^b	0.20 ^a
	T ₃	28.00 ±	1.52 ±	5.93 ±	185.57 ±	21.19 ±	4.66 ±
		0.73 ^a	0.07 ^a	0.20 ^a	6.00 ^a	0.39 ^b	0.19 ^a
ECG	T ₁	31.25 ±	1.68 ±	6.13 ±	187.46 ±	19.57 ±	4.90 ±
		1.93 ^a	0.08 ^a	0.45 ^a	15.26 ^a	0.26 ^a	0.33 ^a
	T ₂	26.50 ±	1.62 ±	5.74 ±	163.35 ±	21.60 ±	4.65 ±
		1.89 ^a	0.11 ^a	0.48 ^a	0.67 ^a	0.30 ^a	0.22 ^a
	T ₃	29.25 ±	1.59 ±	6.98 ±	183.11 ±	23.90 ±	5.20 ±
		2.32 ^a	0.11 ^a	0.56 ^a	3.48 ^a	0.69 ^a	0.42 ^a
CG	T ₁	28.50 ±	1.53 ±	5.97 ±	188.77 ±	20.95 ±	5.06 ±
		0.88 ^a	0.10 ^a	0.35 ^a	11.43 ^a	0.99 ^{a, c}	0.33 ^a
	T ₂	30.20 ±	1.65 ±	6.41 ±	182.02 ±	21.05 ±	4.92 ±
		2.83 ^a	0.11 ^a	0.74 ^a	6.57 ^a	0.47 ^a	0.08 ^a
	T ₃	22.80 ±	1.36 ±	4.85 ±	169.08 ±	21.64 ±	4.08 ±
		2.00 ^a	0.14 ^a	0.34 ^a	7.07 ^a	1.35 ^a	0.40 ^a
AG	T ₁	25.80 ±	1.40 ±	5.34 ±	183.03 ±	20.80 ±	4.68 ±
		1.59 ^a	0.03 ^a	0.33 ^a	9.82 ^a	1.00 ^{a, c}	0.33 ^a
	T ₂	26.66 ±	1.36 ±	5.77 ±	195.08 ±	21.65 ±	4.56 ±
		1.90 ^a	0.07 ^a	0.45 ^a	6.07 ^a	0.78 ^a	0.20 ^a
	T ₃	28.83 ±	1.65 ±	5.84 ±	174.51 ±	20.28 ±	4.83 ±
		1.44 ^a	0.06 ^a	0.26 ^a	4.86 ^a	0.25 ^a	0.14 ^a

638 WCG = water control group; ECG = ethanol control group; CG = citral group and AG = *Aloysia*
 639 group.

640 HT = hematocrit (%); RBC = red blood cells ($\times 10^6 \mu\text{L L}^{-1}$); HB = hemoglobin (g dL^{-1}); MCV
 641 = mean corpuscular volume (fL); MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration (%);
 642 TPP = total plasma protein (g dL^{-1}).

643 ^{a, b} Different letters in the columns indicate statistical difference in same group at different times.

644 ^c Indicates statistical difference compared to WCG at the same time ($n = 6$, $P < 0.05$, Two-way
 645 ANOVA and Tukey).

646 **Table 3**

647 Leukogram of silver catfish (*Rhamdia quelen*) on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after
 648 exposure to *Aloysia citriodora* Paláu EO and citral.

		Total leukocytes	Neutrophils	Monocytes	Lymphocytes
WCG	T ₁	28020.00 ±	20537.80 ±	1048.80 ±	6433.40 ±
		2760.32 ^a	1757.44 ^a	266.75 ^a	1188.30 ^a
	T ₂	21575.00 ±	12016.75 ±	531.00 ±	9027.25 ±
		2624.04 ^a	1832.64 ^a	102.13 ^a	1773.52 ^a
	T ₃	25400.00 ±	14686.83 ±	1053.83 ±	9659.33 ±
		2212.23 ^a	2556.00 ^a	189.42 ^a	776.68 ^a
ECG	T ₁	27400.00 ±	20647.50 ±	538.50 ± 94.72 ^a	6214.00 ±
		1166.90 ^a	1695.65 ^a		681.46 ^a
	T ₂	23650.00 ±	13581.75 ±	720.75 ±	9347.50 ±
		1898.46 ^a	2495.45 ^a	193.13 ^a	1008.31 ^a
	T ₃	22325.00 ±	11562.75 ±	1102.00 ±	9660.25 ±
		4326.15 ^a	3468.77 ^a	517.97 ^a	2008.30 ^a
CG	T ₁	25050.00 ±	16082.50 ±	742.83 ±	8191.33 ±
		4089.72 ^a	3833.65 ^a	288.39 ^a	1978.20 ^a
	T ₂	30260.00 ±	20063.80 ±	903.20 ±	9293.00 ±
		3529.67 ^a	2849.59 ^a	242.71 ^a	1176.86 ^a
	T ₃	27100.00 ±	20790.40 ±	794.40 ±	5515.20 ±
		4295.46 ^a	4539.77 ^a	318.04 ^a	742.17 ^a
AG	T ₁	24920.00 ±	19059.60 ±	744.80 ±	5115.60 ±
		4943.01 ^a	4256.30 ^a	149.26 ^a	1196.46 ^a
	T ₂	20966.66 ±	13995.83 ±	789.00 ±	6181.83 ±
		1823.85 ^a	1965.25 ^a	129.90 ^a	545.94 ^a
	T ₃	21533.33 ±	14340.50 ±	990.16 ±	6202.66 ±
		3130.35 ^a	3427.12 ^a	198.22 ^a	597.07 ^a

649 WCG = water control group; ECG = ethanol control group; CG = citral group and AG =
 650 *Aloysia* group.

651 ^a There was no significant difference between groups in the same parameter ($n = 6$, $P < 0.05$,

652 Two-way ANOVA and Tukey).

653 **Table 4**

654 Biochemical parameters (enzymes and lipids) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to
 655 anesthesia with *Aloysia citriodora* Paláu EO and citral on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3) after
 656 exposure.

		ALT	AST	ALP	GGT	CHO	TRI
WCG	T ₁	9.00 ±	66.40 ±	4.00 ±	2.40 ±	159.21 ±	260.61 ±
		4.01 ^a	20.19 ^a	0.83 ^a	0.67 ^a	16.74 ^a	59.03 ^a
	T ₂	11.75 ±	95.25 ±	3.00 ±	2.75 ±	139.21 ±	393.38 ±
		1.43 ^a	9.47 ^a	1.00 ^a	1.10 ^a	11.37 ^a	39.98 ^a
	T ₃	6.83 ±	63.83 ±	3.00 ±	3.50 ±	156.06 ±	417.26 ±
		1.37 ^a	12.26 ^a	0.81 ^a	0.71 ^a	25.50 ^a	84.71 ^a
ECG	T ₁	9.25 ±	84 ±	3.50 ±	3.25 ±	164.65 ±	327.64 ±
		3.59 ^a	22.82 ^a	1.19 ^a	1.10 ^a	18.85 ^a	97.34 ^a
	T ₂	6.00 ±	51.75 ±	3.00 ±	3.75 ±	122.67 ±	485.32 ±
		1.95 ^a	12.51 ^a	0.91 ^a	1.37 ^a	12.12 ^a	23.42 ^a
	T ₃	4.75 ±	42.25 ±	3.75 ±	3.50 ±	139.94 ±	355.70 ±
		0.62 ^a	3.56 ^a	1.54 ^a	1.65 ^a	17.44 ^a	72.54 ^a
CG	T ₁	8.16 ±	72.5 ±	3.66 ±	3.33 ±	142.97 ±	345.63 ±
		1.16 ^a	12.99 ^a	0.61 ^a	0.71 ^a	8.24 ^a	84.01 ^a
	T ₂	5.40 ±	51.6 ±	3.40 ±	3.80 ±	128.91 ±	361.49 ±
		1.28 ^a	9.74 ^a	0.87 ^a	1.11 ^a	20.09 ^a	80.41 ^a
	T ₃	9.20 ±	69.4 ±	3.40 ±	4.00 ±	131.14 ±	304.66 ±
		2.63 ^a	17.22 ^a	0.74 ^a	0.70 ^a	16.24 ^a	78.01 ^a
AG	T ₁	8.66 ±	73.33 ±	3.33 ±	3.16 ±	128.91 ±	361.49 ±
		1.74 ^a	19.36 ^a	0.80 ^a	0.65 ^a	20.09 ^a	80.41 ^a
	T ₂	4.50 ±	51.33 ±	3.33 ±	3.16 ±	128.18 ±	509.73 ±
		0.67 ^a	4.92 ^a	0.66 ^a	0.74 ^a	10.61 ^a	62.08 ^a
	T ₃	6.50 ±	56.33 ±	3.83 ±	3.50 ±	141.88 ±	479.26 ±
		1.11 ^a	11.49 ^a	1.01 ^a	1.11 ^a	22.91 ^a	41.68 ^a

657 WCG = water control group; ECG = ethanol control group; CG = citral group and AG =
 658 *Aloysia* group.

659 ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; ALP = alkaline
 660 phosphatase; GGT = gamma-glutamyltransferase (UI).

661 CHO = cholesterol; TRI = triglycerides (mg dL⁻¹).

662 ^a There was no significant difference between groups in the same parameter ($n = 6$, $P < 0.05$,

663 Two-way ANOVA and Tukey).

664 **Table 5**

665 Biochemical parameters (metabolites and glucose) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed
 666 to anesthesia with *Aloysia citriodora* Paláu EO and citral on days 0 (T1), 2 (T2) and 6 (T3)
 667 after exposure.

		URE	CRE	UA	LAC	GLU
WCG	T ₁	8.00 ±	0.26 ±	1.06 ±	52.96 ±	50.92 ±
		1.14 ^a	0.06 ^a	0.13 ^a	7.11 ^a	8.33 ^a
	T ₂	2.50 ±	0.20 ±	0.97 ±	33.34 ±	42.92 ±
		0.50 ^a	0.04 ^a	0.24 ^a	8.05 ^a	8.99 ^a
	T ₃	4.83 ±	0.20 ±	0.87 ±	37.76 ±	32.02 ±
		1.07 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	7.03 ^a	8.00 ^a
ECG	T ₁	6.25 ±	0.22 ±	0.88 ±	48.22 ±	43.89 ±
		3.03 ^a	0.09 ^a	0.07 ^a	7.17 ^a	12.66 ^a
	T ₂	6.25 ±	0.22 ±	1.07 ±	49.69 ±	49.63 ±
		1.31 ^a	0.02 ^a	0.29 ^a	7.47 ^a	10.92 ^a
	T ₃	5.50 ±	0.22 ±	0.92 ±	50.50 ±	73.16 ±
		1.32 ^a	0.06 ^a	0.28 ^a	13.91 ^a	11.28 ^a
CG	T ₁	4.00 ±	0.25 ±	1.00 ±	35.41 ±	47.96 ±
		1.65 ^a	0.03 ^a	0.17 ^a	8.81 ^a	7.64 ^a
	T ₂	6.33 ±	0.31 ±	1.23 ±	57.70 ±	44.30 ±
		1.49 ^a	0.05 ^a	0.13 ^a	8.28 ^a	10.67 ^a
	T ₃	4.80 ±	0.20 ±	0.85 ±	31.77 ±	34.52 ±
		0.20 ^a	0.04 ^a	0.06 ^a	5.31 ^a	7.99 ^a
AG	T ₁	6.33 ±	0.31 ±	1.23 ±	57.70 ±	44.30 ±
		1.49 ^a	0.05 ^a	0.13 ^a	8.28 ^a	10.67 ^a
	T ₂	5.33 ±	0.40 ±	1.08 ±	34.24 ±	54.14 ±
		0.71 ^a	0.05 ^a	0.11 ^a	3.56 ^a	6.33 ^a
	T ₃	4.66 ±	0.43 ±	1.13 ±	28.97 ±	53.33 ±
		0.61 ^a	0.12 ^a	0.13 ^a	6.23 ^a	5.89 ^a

668 WCG = water control group; ECG = ethanol control group; CG = citral group and AG =
 669 *Aloysia* group.

670 URE = urea; CRE = creatinine; UA = uric acid; LAC = lactate; GLU = glucose (mg dL⁻¹).

671 ^a There was no significant difference between groups in the same parameter ($n = 6$, $P < 0.05$,

672 Two-way ANOVA and Tukey).

673 **Table 6**

674 Biochemical parameters (proteins and ions) of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to
 675 anesthesia with *Aloysia citriodora* Paláu EO and citral on days 0 (T₁), 2 (T₂) and 6 (T₃) after
 676 exposure.

		TP	ALB	GLO	Cl ⁻	Na ⁺
WCG	T ₁	2.49 ±	0.84 ±	1.64 ±	132.20 ±	136.60 ±
		0.23 ^a	0.07 ^a	0.18 ^a	3.99 ^a	3.66 ^a
	T ₂	3.39 ±	0.88 ±	2.51 ±	131.75 ±	137.00 ±
		0.38 ^a	0.12 ^a	0.42 ^a	4.23 ^a	4.02 ^a
	T ₃	3.48 ±	1.06 ±	2.41 ±	128.16 ±	137.16 ±
		0.25 ^a	0.11 ^a	0.32 ^a	2.21 ^a	3.24 ^a
ECG	T ₁	3.94 ±	1.10 ±	2.84 ±	130.25 ±	142.75 ±
		0.50 ^a	0.13 ^a	0.38 ^a	2.92 ^a	2.95 ^a
	T ₂	2.95 ±	0.77 ±	2.17 ±	134.00 ±	142.00 ±
		0.34 ^a	0.11 ^a	0.41 ^a	4.50 ^a	2.85 ^a
	T ₃	3.25 ±	0.80 ±	2.45 ±	134.00 ±	140.00 ±
		0.34 ^a	0.07 ^a	0.33 ^a	3.87 ^a	4.70 ^a
CG	T ₁	3.28 ±	1.01 ±	2.27 ±	130.66 ±	136.33 ±
		0.40 ^a	0.09 ^a	0.37 ^a	3.70 ^a	3.36 ^a
	T ₂	3.32 ±	0.79 ±	2.53 ±	135.60 ±	137.00 ±
		0.57 ^a	0.12 ^a	0.49 ^a	3.28 ^a	1.64 ^a
	T ₃	3.22 ±	0.76 ±	2.45 ±	136.00 ±	136.40 ±
		0.51 ^a	0.14 ^a	0.49 ^a	3.31 ^a	2.67 ^a
AG	T ₁	3.32 ±	0.79 ±	2.50 ±	131.16 ±	134.33 ±
		0.57 ^a	0.12 ^a	0.49 ^a	4.67 ^a	3.00 ^a
	T ₂	3.16 ±	1.03 ±	2.12 ±	130.00 ±	140.5 ±
		0.18 ^a	0.06 ^a	0.14 ^a	4.67 ^a	2.86 ^a
	T ₃	3.46 ±	0.97 ±	2.49 ±	127.16 ±	139.83 ±
		0.19 ^a	0.06 ^a	0.19 ^a	2.90 ^a	3.30 ^a

677 WCG = water control group; ECG = ethanol control group; CG = citral group and AG =
 678 *Aloysia* group.

679 TP = total proteins; ALB = albumins; GLO = globulins (g dL⁻¹).

680 Cl⁻ = chlorides; Na⁺ = sodium (mmol L⁻¹).

681 ^a There was no significant difference between groups in the same parameter ($n = 6$, $P < 0.05$,

682 Two-way ANOVA and Tukey).

683 **Figure legends**

684

685 **Figure 1.** Time required for sedation induction by citral in silver catfish (*Rhamdia quelen*,
686 RQ) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, CI) ($n = 8$ per treatment) according to Small
687 (2003). Data are means \pm standard error. Different letters in the columns indicate a significant
688 difference between the concentrations of the same species. *Significant difference between
689 the different species at the same concentrations ($p < 0.05$).

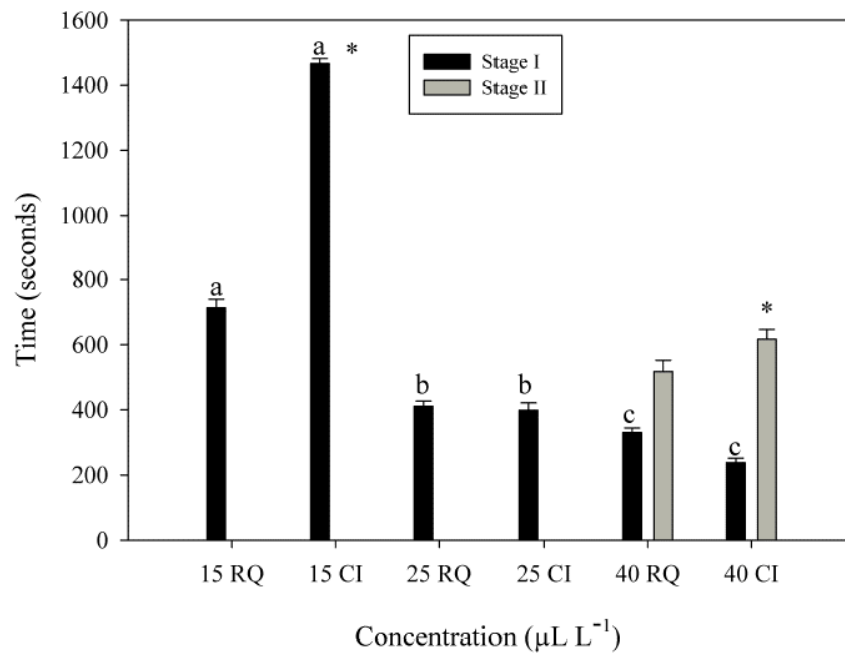
690

691 **Figure 2.** Time required for induction and recovery from anesthesia by citral in A - silver
692 catfish (*Rhamdia quelen*, RQ) and B - grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, CI) ($n = 8$ per
693 treatment) according to Small (2003). Data are means \pm standard error. Different letters in the
694 columns indicate a significant difference between the concentrations of the same species ($p <$
695 0.05).

696

697 **Figure 3.** Time required for induction and recovery from anesthesia by citral ($n = 8$ per
698 treatment) in silver catfish (*Rhamdia quelen*, RQ) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*,
699 CI) according to Small (2003). Data are means \pm standard error. *Significant difference
700 between the different species at the same concentrations ($p < 0.05$).

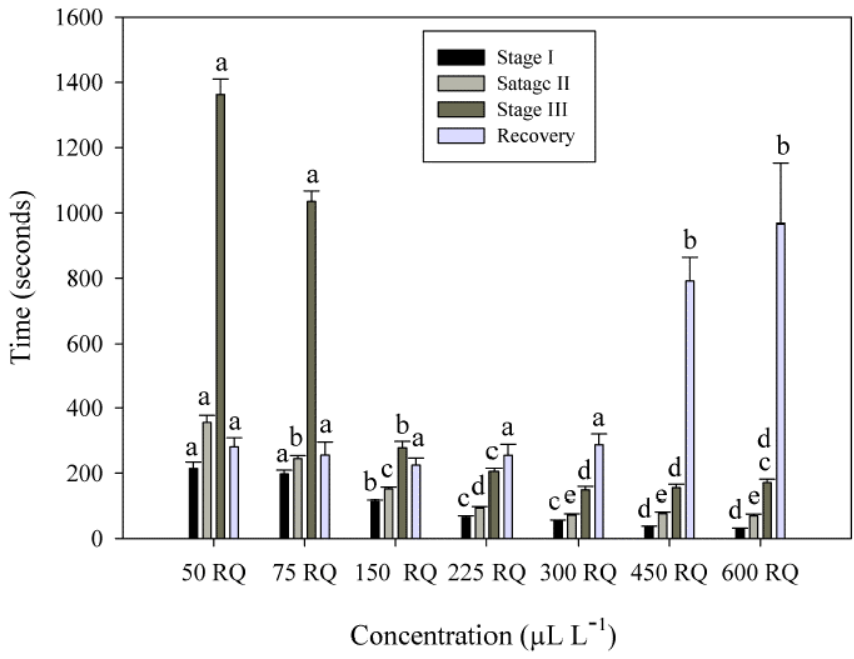
701

702 **Figure 1**

703

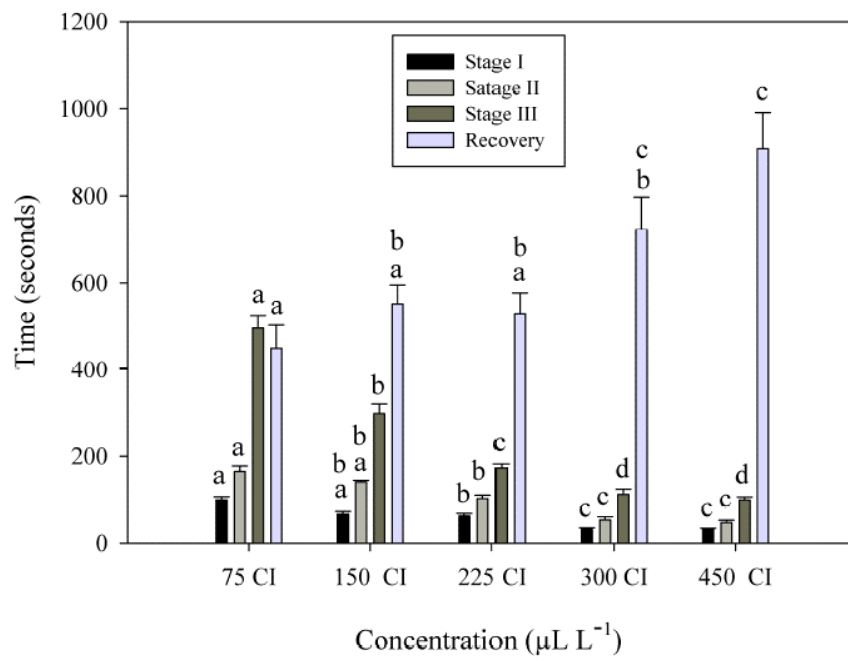
704

705 **Figure 2A**



706

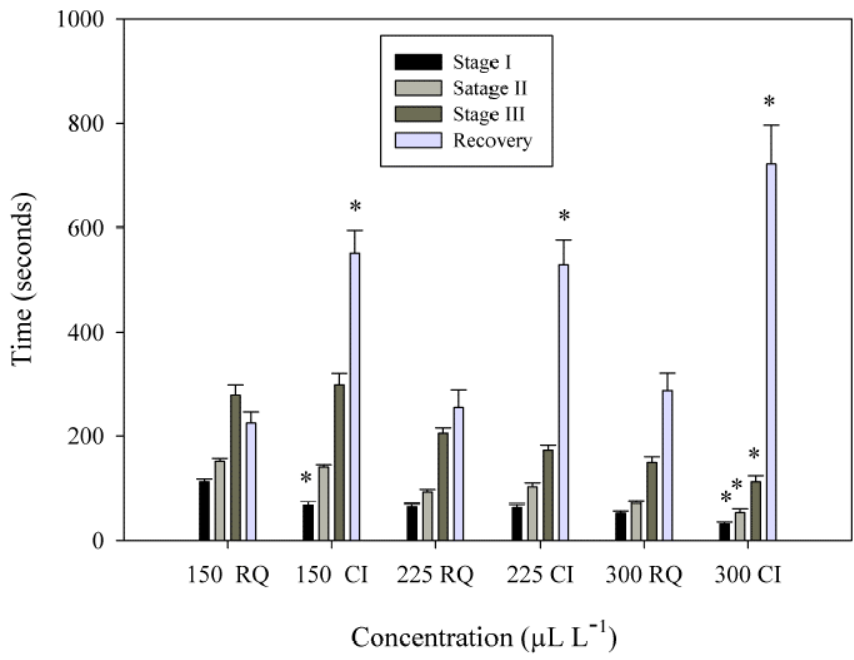
707

708 **Figure 2B**

709

710

711 **Figure 3**



712

713

2.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS RESULTADOS OBTIDOS

2.2.1 A ligação do efeito sedativo e anestésico do OE de *A. citriodora* Paláu com o citral e a ausência de efeitos colaterais durante a indução e recuperação dos procedimentos em peixes

A ausência de efeitos colaterais observáveis durante a indução e recuperação de procedimentos sedativos e anestésicos em peixes é uma característica desejável para os novos anestésicos (ROSS; ROSS, 2008). No presente estudo, os procedimentos de sedação e anestesia induzidos pelo citral em jundiá e carpa-capim, assim como o verificado para o MS-222 (PŘÍBORSKÝ; VELÍŠEK, 2018) e para o OE de *A. citriodora*, em diversas espécies de peixes, não foram associados a efeito colateral nos animais (BECKER et al., 2017; GRESSLER et al., 2014; SANTOS et al., 2017; PARODI et al., 2014, 2020; TEIXEIRA et al., 2017).

O mesmo não ocorreu para alguns OEs de plantas que apresentaram eficácia sedativa e anestésica em peixes. O OE de *A. gratissima* foi associado à contrações musculares involuntárias em jundiá durante a indução e recuperação de anestesia (BENOVIT et al., 2015). Durante a recuperação dos procedimentos anestésicos em jundiá, independentemente da concentração utilizada, o OE extraído de inflorescências de *Hyptis mutabilis* foi associado a episódios de hiperatividade, com nado em círculos ou espasmos musculares e, alternância de períodos de imobilidade e movimentação com perda parcial do equilíbrio. Apesar do OE de *H. mutabilis* derivado de folhas da planta ter induzido sedação e anestesia sem efeitos colaterais observáveis, o globulol isolado deste OE foi ligado à indução de contrações musculares que fizeram os animais lembrar a “letra C”, além de nado circular intercalado com períodos de imobilidade, durante a recuperação dos procedimentos (SILVA et al., 2013a). Perda de muco foi observada em jundiá anestesiado com o OE de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) (SILVA et al., 2013b). Em peixe-palhaço (*Amphiprion clarkii*) anestesiados a partir do OE *Ocimum basilicum*, os animais demonstraram espasmos musculares durante a indução anestésica, biometria e avaliação da sensibilidade a estímulos externos (CORREIA et al., 2018).

A eficácia do OE de *A. citriodora* como agente sedativo e anestésico em peixes é comprovada (BECKER et al., 2017; GRESSLER et al., 2014; SANTOS et al., 2017; PARODI et al., 2014, 2020; TEIXEIRA et al., 2017). Embora o citral tenha sido verificado como o componente mais abundante dos OEs utilizados nos estudos referenciados imediatamente acima, até o momento não havia uma ligação definitiva do efeito observado para o OE de *A. citriodora* com o citral. Para Benovit et al. (2015), analisando a eficácia anestésica do OE de *A.*

gratíssima, o efeito anestésico verificado é resultado da interação entre os seus componentes e, através da correlação do efeito anestésico observado para o OE de *A. gratíssima*, contra o efeito dos componentes mais abundantes utilizados isoladamente foi possível estabelecer quais componentes estavam relacionados com o efeito anestésico e quais componentes estavam relacionados com os efeitos colaterais observados.

Para Parodi et al. (2020), o efeito anestésico do OE de *A. citriodora* varia de acordo com a época da colheita das plantas, juntamente com a disponibilidade e quantidade dos componentes de cada amostra e, não houve relação significativa entre a porcentagem de α -citral e β -citral (ou a porcentagem da combinação de isômeros) com o tempo necessário para induzir anestesia profunda ou para recuperação dos animais. Portanto, o presente estudo relata pela primeira vez a ação sedativa e anestésica do citral em peixes e, devido ao OE de *A. citriodora* ser uma substância de composição variável, o que pode resultar em variações nas respostas observadas, por este aspecto, o citral parece ser a opção mais adequada para o desenvolvimento de uma nova droga para peixes.

2.2.2 A mortalidade nos estudos sobre a eficácia anestésica do OE de *A. citriodora* Paláu e do citral em peixes

O citral adicionado à água induziu anestesia sem mortalidade a curto prazo (2 dias pós-procedimento) a partir de concentrações que variaram entre 50 a 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ em jundiá e 75 a 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ em carpa-capim. Mortalidade foi registrada nos procedimentos induzidos a partir de 675 $\mu\text{L L}^{-1}$ em jundiá e 600 $\mu\text{L L}^{-1}$ em carpa-capim. Os óbitos foram verificados por aprofundamento da anestesia até falha respiratória irreversível, mesmo após a troca dos animais da solução anestésica para a água apenas, para recuperação.

O presente estudo traz informações sobre as concentrações de citral adicionado à água que são capazes de causar a morte em jundiá e carpa-capim, durante a realização de procedimentos anestésicos. Durante a indução e recuperação de anestesia, Gressler et al. (2014) e Santos et al. (2017) relataram anestesia sem mortalidade em jundiá, a partir das concentrações de 150 e 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 150 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente. O mesmo foi verificado para jundiá das variedades cinza e albino anestesiados a partir de concentrações que variaram de 100 a 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ (PARODI et al., 2014). Teixeira et al. (2017) e Becker et al. (2017) relataram anestesia sem mortalidade durante os procedimentos em tilápia-do Nilo e *Lophiosilurus alexandri*, nas concentrações de 80 a 450 e 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ a 400 $\mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente.

A verificação da concentração de citral adicionado à água capaz de induzir mortalidade em jundiá e carpa-capim foi importante para demonstrar a ampla margem de segurança dos procedimentos realizados, uma vez que a concentração mínima efetiva para alcançar o efeito máximo nas duas espécies foi de 300 $\mu\text{L L}^{-1}$. Mais estudos são necessários para compreender se o OE de *A. citriodora* é uma substância mais segura que o citral na indução de anestesia em peixes, já que o uso do isolado resultou em mortalidade a partir de concentrações que não foram letais, por ocasião do uso do OE de *A. citriodora*.

2.2.3 A duração dos procedimentos anestésicos em peixes

O MS-222 é a substância autorizada como droga sedativa e anestésica mais difundida mundialmente para uso em peixes criados para consumo (SANTOS; CUNHA, 2021). A partir dos estudos sobre a eficácia da droga foram recomendados quatro usos considerados seguros: anestesia rápida, anestesia moderadamente rápida, sedação e manutenção de anestesia. Os dois primeiros usos são recomendados para procedimentos de manejo como desova, marcação, biometria ou procedimentos cirúrgicos, dependendo do tempo necessário para a realização de tais procedimentos. A sedação é indicada para transporte e as soluções de manutenção são indicadas para procedimentos moderadamente rápidos ou procedimentos mais longos (SCHOETTGER; JULIN, 1967; TRICAINE-S, 1997).

A eficácia de procedimentos anestésicos em peixes pode ser avaliada pelo tempo decorrido para a indução e recuperação de anestesia. A eficácia em induzir anestesia rápida é característica desejável para qualquer substância sedativa e anestésica para uso em peixes (GILDERHUS; MARKING, 1987; MARKING; MEYER, 1985; ROSS; ROSS, 2008). A indicação da concentração ideal para anestesia rápida tem sido uma preocupação bastante difundida na avaliação da eficácia dos procedimentos anestésicos induzidos pelo OE de *A. citriodora* em peixes (BECKER et al., 2017; GRESSLER et al., 2014; PARODI et al., 2014, 2020; SANTOS et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017). Estudos sobre sedação para transporte de peixes também estão disponíveis para o OE de *A. citriodora* (PARODI et al., 2014; ZEPPEFELD et al., 2014), embora estudos sobre a estruturação de procedimentos mais longos ou manutenção de anestesia não estejam disponíveis. Portanto o presente estudo amplia os conhecimentos já mais abundantemente explorados para o OE de *A. citriodora* em peixes, mais centrados no estudo da anestesia rápida, dando ênfase a procedimentos mais longos, a partir da lógica da utilização de soluções de manutenção de anestesia.

2.2.4 Anestesia rápida: indução e recuperação rápidas de anestesia pelo citral em jundiá e carpa-capim

Segundo Marking e Meyer (1985), para procedimentos rápidos é desejável que o anestésico seja eficaz em induzir anestesia em tempo inferior a 3 min (180 s), com recuperação deste procedimento em tempo inferior a 5 min (300 s). Para Gilderhus e Marking (1987) o tempo de recuperação deve ser inferior a 10 min (600 s).

Para Ross e Ross (2008), o MS-222 adicionado à água induz anestesia rapidamente, com tempos de recuperação igualmente rápidos, podendo induzir anestesia dentro de 15 s em alguns salmonídeos. Para Příborský e Velíšek (2018) o MS-222 é eficaz para induzir anestesia rápida em “alewife” (*Alosa pseudoharengus*), “allied kingfish” (*Seriola dumerili*), truta-do-Ártico (*Salvelinus alpinus*), achigã ou “American black bass” (*Micropterus salmoides*), enguia-Americana (*Anguilla rostrata*), “American mackerel” (*Scomber japonicus*), lambari-tambiú (*Astyanax altiparanae*), bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), “Atlantic halibut” (*Hippoglossus hippoglossus*), salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*), carpa-cabeçuda (*Hypophthalmichthys nobilis*), “black-head minnow” (*Pimephales promelas*), “black king fish” (*Rachycentron canadum*), “black sea bass” (*Centropristis striata*), “blackspot seabream” (*Pagellus bogaraveo*), “black spinefoot” (*Siganus rivulatus*), bonejack (*Alosa mediocris*), “brook trout” (*Salvelinus fontinalis*), Brycon cephalus, pirapitinga ou caranha ou cachama (*Piaractus brachyomus*), “Caspian brown trout” (*Salmo trutta caspius*), “channel bass” (*Sciaenops ocellatus*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*), “sea bass”, carpa-comum, *Coreius guichenoti*, “denison barb” (*Puntius denisonii*), acará-disco (*Symphysodon discus*), “duckbill cat” (*Polyodon spathula*), “European perch” (*Perca fluviatilis*), pike-perch (*Sander lucioperca*), “fountain darter” (*Etheostoma fonticola*), “genuine porgy” (*Pagrus major*), peixe-dourado, “gold-line sea bream”, (*Rhabdosargus sarba*), carpa-capim, “green swordtail” (*Xiphophorus hellerii*), guppy (*Poecilia reticulata*), “lumpsucker” (*Cyclopterus lumpus*), plati (*Xiphophorus maculatus*), “mutton snapper (*Lutjanus guttatus*), esturjão-persa (*Acipenser persicus*), molinésias (*Poecilia latipinna* e *Poecilia vivipara*), truta-arco-íris, robalo-riscado (*Morone saxatilis*), “european catfish”, “snapper” (*Chrysophrys auratus*), *Solea senegalensis* e paulistinha ou zebrafish (*Danio rerio*).

No presente estudo, as concentrações de citral adicionado à água que alcançaram o nível máximo de efeito observado foram eficazes em induzir anestesia em tempo inferior a 3 min. Apenas no jundiá foi possível a recuperação anestésica em tempo inferior a 5 min, já que na carpa-capim, o tempo de recuperação do procedimento induzido pela concentração mínima

efetiva de citral capaz de atingir o nível máximo de efeito, ficou ligeiramente acima de 10 min. Dessa forma, o citral foi eficaz em induzir anestesia rápida em jundiá, segundo os padrões preconizados por Marking e Meyer (1985). O tempo de recuperação anestésica verificado para a carpa-capim, embora tenha ficado fora do padrão sugerido por Marking e Meyer (1985), ficou próximo ao tempo máximo de 10 min (600 s), sugerido por Gilderhus e Marking (1987) como desejável. Então, a partir destes resultados, ficou demonstrada a eficácia do citral em induzir anestesia rápida em jundiá e carpa capim, sendo que, nesse nível de efeito, tempos de recuperação maiores são necessários para a carpa-capim.

A concentração mínima efetiva de citral capaz de alcançar o efeito máximo em jundiá e carpa-capim foi $300 \mu\text{L L}^{-1}$, sendo a concentração mais adequada para anestesia rápida em ambas as espécies. Em jundiá e carpa-capim, o incremento nas concentrações utilizadas não diminuiu significativamente o tempo para a indução anestésica, embora os tempos de recuperação tenham sido maiores, extrapolando cada vez mais o limite desejável para o tempo de recuperação (GILDERHUS; MARKING, 1987; MARKING; MEYER, 1985). A partir do OE de *A. citriodora* como agente anestésico, também em juvenis de jundiá, a concentração de $300 \mu\text{L L}^{-1}$ foi eficaz em induzir anestesia em torno de 3 min (180 s), com tempo de recuperação abaixo de 5 min (300 s) (SANTOS et al., 2017). Parodi et al. (2014) relataram tempos de indução maiores que 3 min (180 s), com tempos de recuperação entre 5min (300 s) e 10 min (600 s), para juvenis de jundiá cinza e albino submetidos a $300 \mu\text{L L}^{-1}$ de OE de *A. citriodora*. Ainda com juvenis de jundiá, quatro diferentes amostras do OE de *A. citriodora*, colhidas durante o verão, outono, inverno e primavera, na concentração de $300 \mu\text{L L}^{-1}$, não foram capazes de induzir anestesia em período inferior a 3 min (180 s), com tempos de recuperação verificados entre 5 min (300 s) e 10 min (600 s) (PARODI et al., 2020). Em tilápia-do-Nilo, a partir de $300 \mu\text{L L}^{-1}$ do OE de *A. citriodora* foi possível induzir anestesia em período inferior a 3 min (180 s), com recuperação de anestesia em torno de 5 min (600 s) (TEIXEIRA et al., 2017). Em *Lophiosilurus alexandri*, $400 \mu\text{L L}^{-1}$ de OE de *A. citriodora* induziu anestesia em tempo inferior a 3 min (180 s), com recuperação inferior a 10 min (600 s) (BECKER et al., 2017).

Portanto o citral foi eficaz em induzir anestesia rápida em peixes, com efeito semelhante ao verificado para o OE de *A. citriodora* em jundiá, tilápia-do-Nilo e *Lophiosilurus alexandri*. Estes resultados sugerem que o citral é responsável por grande parte do efeito anestésico do OE de *A. citriodora*, uma vez que isoladamente pode alcançar níveis semelhantes aos verificados para o OE em estado bruto.

2.2.5 A segurança do procedimento de indução e manutenção de anestesia em jundiá

Segundo Marking e Meyer (1985), a partir de questionários aplicados a trabalhadores de pisciculturas, tempos de exposição aos anestésicos entre 5 e 10 min (300 a 600 s) são os mais referidos para a realização de procedimentos de manejo com peixes. As concentrações de anestésico utilizadas para indução de anestesia rápida, devido aos tempos de recuperação serem igualmente rápidos, não permitem o tempo necessário para a realização de procedimentos mais longos. (ROSS; ROSS, 2008; MARKING; MEYER, 1985; TRICAINE-S, 1997). Para estes procedimentos, a anestesia moderadamente rápida ou a utilização de solução de manutenção é necessária (ROSS; ROSS, 2008; TRICAINE-S, 1997), mas o aumento das concentrações utilizadas ou do tempo de exposição dos animais aos anestésicos podem causar intoxicação e mortalidade (MARKING, 1967).

O procedimento de manutenção de anestesia idealizado para o presente estudo foi baseado na redução da concentração para indução de anestesia, em relação à concentração mínima efetiva capaz de alcançar o efeito máximo observado em jundiá (anestesia rápida), e na manutenção de anestesia a partir da mínima concentração efetiva em induzir anestesia dentro do período máximo proposto de 30 min. O tempo de permanência na concentração imediatamente inferior à concentração ideal para indução rápida foi adaptado para a nova necessidade. A partir do procedimento realizado, anestesia sem efeitos colaterais observáveis durante a indução, manutenção e recuperação foi verificada em jundiá.

A segurança do procedimento de indução e manutenção anestésica realizado a partir do OE de *A. citriodora* e do citral foi verificada por determinações hematológicas, bioquímicas e de mortalidade, sendo que nenhum animal veio a óbito até o encerramento do estudo. Relativamente ao OE de *A. citriodora*, Gressler et al. (2014) também utilizaram concentrações abaixo do necessário para induzir anestesia rápida, o que resultou melhora de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, em relação aos animais controle.

A quase ausência de diferenças significativas no eritrograma dos jundiás submetidos ao procedimento de manutenção de anestesia realizado no presente estudo, também foi evidenciada a partir de outros estudos sobre anestesia, em diferentes espécies de peixes. São os casos do: óleo de cravo em truta-arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), “european catfish” (*Silurus glanis* L.), “vimba breams” (*Vimba vimba*), “pikeperch” (*Sander lucioperca* L.), e barbus (*Barbus barbus*); etomidato em truta-arco-íris, “vimba breams”, “pikeperch”, barbus e carpa comum; MS-222 em “vimba breams”, “pikeperch” e barbus; 2-phenoxyethanol em truta-arco-íris, “vimba breams” e barbus (KAZUÑ; SIWICKI,

2012; KŘIŠT'AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; PŘÍBORSKÝ et al., 2015; VELÍŠEK et al., 2005; 2006; VELÍŠEK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2005, 2007; WITESKA; DUDYK; JARKIEWICZ, 2015).

O leucograma dos jundiás anestesiados pelo citral ou pelo OE de *A. citriodora* não demonstraram alteração significativa nas contagens realizadas, em nenhum dos momentos pós-procedimento propostos. O mesmo foi verificado com: óleo de cravo em trutas-arco-íris, carpas comuns, “vimba breams” e barbus; 2-fenoxietanol em truta-arco-íris, “european catfish”, “vimba breams” e barbus e MS-222; etomidato em “vimba breams” e barbus (LEPIC et al., 2014; PŘÍBORSKÝ et al., 2015; VELÍŠEK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2007; VELÍŠEK et al., 2007). Em contraste, a anestesia com óleo de cravo induziu leucopenia com linfopenia e neutrofilia em “european catfish” (VELÍŠEK et al., 2006). O 2-fenoxietanol induziu monocitose em carpas comuns (VELÍŠEK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2007) e, 2-fenoxietanol e etomidato induziram leucocitose leve por neutrofilia e monocitose com linfopenia também em carpas comuns (WITESKA; DUDYK; JARKIEWICZ, 2015). Křišť'an et al. (2012) relataram leucopenia em “pikeperch” anestesiado por MS-222, 2-fenoxietanol, etomidato e óleo de cravo.

Assim como o relatado por Lepic et al. (2014) para o óleo de cravo em “vimba breams”, os procedimentos anestésicos com citral e OE de *A. citriodora* realizados no presente estudo não induziram variações significativas nos parâmetros bioquímicos determinados. Logo, considerando que parâmetros bioquímicos como enzimas, metabólitos, proteínas, lipídios e íons são importantes para avaliar o estado de saúde dos peixes (ANDERSON et al., 2010; BUCHER, 1990; GRESSLER et al., 2015; ROY; BHATTACHARYA, 2005), a anestesia com citral e OE de *A. citriodora* não parece afetar a homeostase dos jundiás. Em contraste, o 2-fenoxietanol causou variações significativas na alanina aminotransferase em carpas comuns, alanina aminotransferase, glicose e albumina em “european catfish”, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose e lactato em truta-arco-íris, aspartato aminotransferase e glicose em “vimba breams” e triglicerídeos em “pikeperch” (KŘIŠT'AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; VELÍŠEK; SVOBODOVÁ, 2004; VELÍŠEK et al., 2011; VELÍŠEK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2007).

Levando em consideração os parâmetros bioquímicos observados, diversamente à ausência de variações significativas observadas no presente estudo, em todos os momentos propostos, variações significativas do lactato determinado após anestesia com etomidato foram documentadas em trutas arco-íris, assim como, de aspartato aminotransferase e glicose em “vimba breams” e triglicerídeos em “pikeperch”. Anestesia com MS-222 induziu variações

significativas em fosfatase alcalina, glicose e lactato em truta-arco-íris, triglicerídeos em “vimba breams” e glicose em “pikeperch” (KŘIŠT'AN et al., 2012; LEPIC et al., 2014; VELÍŠĚK et al., 2011). Anestesia com óleo de cravo causou alterações significativas de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e glicose em trutas arco-íris, glicose em carpas comuns, alanina aminotransferase e triglicerídeos em “european catfish” e glicose em “pikeperch” (KŘIŠT'AN et al., 2012; VELÍŠĚK et al., 2005; 2006; 2011; VELÍŠĚK; SVOBODOVÁ; PIAČKOVÁ, 2005).

Devido ao valor do CHCM ter sido o único parâmetro determinado a variar significativamente nos animais anestesiados pelo OE de *A. citriodora* e pelo citral, em relação aos animais controle, entre todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos determinados, os anestésicos não foram associados a grandes alterações na hemostase dos peixes, tendo sido seguros na indução e manutenção de anestesia em jundiá, dentro das condições observadas.

2.2.6 O OE de *A. citriodora* Paláu adicionado à dieta de jundiá e a proteção contra a infecção experimental por *Aeromonas hydrophila*

No presente estudo, o OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá parece ter promovido proteção contra o desafio experimental por *A. hydrophila*. Os peixes alimentados com ração adicionada de 2 ml Kg⁻¹ de OE, durante 21 dias, tiveram maior sobrevivência, além de parâmetros hematológicos e bioquímicos mais favoráveis em relação aos animais controle não tratados, 10 dias após o desafio com a bactéria. Foi verificada queda em todos os parâmetros do eritrograma determinados (hematócrito, número de eritrócitos e hemoglobina), leucocitose por neutrofilia e monocitose, além de linfopenia e hipoproteïnemia sérica nos animais não tratados ou tratados com 1 ml Kg⁻¹.

A *A. hydrophila* causa septicemia em peixes, se manifestando clinicamente com hemorragias, ulcerações, abscessos, líquido ascítico e anemia (AOKI, 1999; AUSTIN; AUSTIN, 2016; CAMUS et al., 1998; MUSA et al., 2007; MONIR et al., 2020; OLESEN; VENDRAMIN, 2016; SAHARIA et al., 2020; STRATEV; ODEYEMI, 2017). Devido a isto, a diminuição verificada nos parâmetros eritrocitários do grupo não tratado e do grupo tratado com 1 ml Kg⁻¹ foi compatível o padrão esperado para a doença. Já os animais tratados com 2 ml Kg⁻¹ de OE de *A. citriodora* tiveram preservadas suas contagens eritrocitários em níveis basais, sugerindo um efeito protetor do OE de *A. citriodora* contra a infecção pela *A. hydrophila*.

A queda nas contagens eritrocitárias verificados no presente estudo também foram verificadas como consequência da infecção experimental pela *A. hydrophila* em tilápia-do-Nilo,

15 dias após o desafio (ORSI et al., 2017), “victoria labeo”, 21 dias após o desafio (NGUGI et al., 2015) e, peixe dourado e carpa-comum 2, 3, e 5 semanas após o desafio (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAMB; HEO, 2010a, b). O mesmo não foi verificado em pacú-caranha em até 9 h após a inoculação com *A. hydrophila* (CLAUDIANO et al., 2019), talvez devido ao pouco tempo transcorrido entre a inoculação e a coleta de sangue, insuficiente para causar dano aos eritrócitos. Em relação aos estudos de Harikrishnan, Balasundaramb e Heo (2010a, b), Ngugi et al. (2015), Orsi et al. (2017) e Claudiano et al. 2015, o presente estudo foi o único a avaliar o caráter regenerativo da doença causada pela *A. hydrophila*, através da contagem de eritroblastos circulantes, como resposta à anemia progressivamente instalada nos jundiás.

Leucocitose por neutrofilia e monocitose, podendo cursar com linfopenia, é um padrão clássico de resposta inflamatória de mamíferos (STOCKHAM; SCOTT, 2008). No presente estudo, este padrão hematológico foi verificado em resposta a infecção por *A. hydrophila* em jundiá, 10 dias após a inoculação experimental. Os jundiás tratados com 2 ml Kg⁻¹ de OE de *A. citriodora* não demonstraram hemograma inflamatório clássico, mas monocitose apenas, sugerindo uma amenização do quadro patológico. Leucocitose também foi verificada como uma reação à inoculação experimental por *A. hydrophila* em peixe-dourado e carpa-comum 2, 3 e 5 semanas pós-desafio (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAMB; HEO, 2010a, b). Diversamente, leucopenia foi verificada 9 h após a inoculação de *A. hydrophila* em pacú-caranha (CLAUDIANO et al., 2019). A diferença observada pode estar relacionada com os diferentes momentos escolhidos para a realização das análises laboratoriais, dentro de horas e não dias após a inoculação da bactéria, para o pacú-caranha. Mais estudos são necessários para avaliar o mecanismo da resposta leucocitária contra a infecção por *A. hydrophila* em peixes.

Assim como o realizado no presente estudo com o OE de *A. citriodora* adicionado à dieta de jundiá, outros OEs de plantas, entre outros extrativos vegetais ou microrganismos selecionados, adicionados à dieta dos peixes ou a partir de outras vias administração têm sido utilizadas contra quadros experimentais de infecção pela *A. hydrophila* (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAMB; HEO, 2010a, b; MBOKANE; MOYO, 2019; SOUZA et al., 2016). Para Souza et al. (2016), o tratamento de jundiá com 50 µL L⁻¹ de OE de *Melaleuca alternifolia*, em banhos medicamentosos diários durante 7 dias consecutivos prévios à inoculação experimental pela bactéria, diminuíram a mortalidade e aumentaram a longevidade dos peixes tratados, embora eficácia curativa não tenha sido demonstrada. A adição de pó de folhas de *Moringa oleífera* na proporção de 9 e 12% da dieta, durante 45 dias prévios à inoculação pela *A. hydrophila*, foi associada à diminuição da mortalidade em tilápia-de-Moçambique

(MBOOKANE; MOYO, 2019). Para Harikrishnan, Balasundaramb e Heo, 2010b, a adição de bactérias lácticas ($2,45 \times 10^9$ e $1,07 \times 10^{11}$ CFU g^{-1} para *Lactobacillus* e “Sporolac”, respectivamente), 6 dias após a inoculação com *A. hydrophila*, foi associada à diminuição da mortalidade e aceleração da recuperação das lesões cutâneas em carpa-comum. Já para Harikrishnan, Balasundaramb e Heo (2010a), a adição à dieta de extrato tri-herbal de *Azadirachta indica*, *Oscimum sanctum* e *Curcuma longa* (em iguais proporções, nas doses de 400 e 800 mg Kg^{-1}), durante 45 dias prévios à inoculação, foi associada à diminuição da mortalidade causada pela *A. hydrophila* em peixe-dourado. Portanto, embora os mecanismos protetores das substâncias naturais contra a infecção pela *A. hydrophila* permaneçam obscuros, o OE de *A. citriodora*, entre outras substâncias naturais, são promissoras no desenvolvimento de novas drogas com ação contra a *A. hydrophila* em peixes.

3 CONCLUSÃO

Embora mais estudos sejam necessários, baseado nos resultados obtidos no presente estudo o OE de *A. citriodora* e o citral são substâncias com potencial uso em piscicultura, quando adicionados à água, como sedativos e anestésicos em jundiá e carpa-capim e, o OE de *A. citriodora*, adicionado à dieta, na proteção contra a infecção por *A. hydrophila* em jundiá, sendo substâncias emergentes para o desenvolvimento de novas drogas veterinárias para uso em peixes.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 328, de 19 de dezembro de 2019.** Dispõe sobre a avaliação do risco à saúde humana de medicamentos veterinários e os métodos de análise para fins de avaliação da conformidade. Brasília: ANVISA, 2019.
- AKBARY, P.; YARAHMADI, S. P.; JAHANBAKHSI, A. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. **Environmental Science and Pollution Research (international)**, v. 25, n. 2, p. 1800-1808, 2018.
- ALI, H.; EL-BELTAGI, H.; NASR, N. F. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2689-2699, 2011.
- ALONSO, J.; DESMARCHEILIER, C. Cedrón. In: **Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.** Buenos Aires: Corpus, 2015. p. 165-172.
- AMERICAN FISHERIES SOCIETY. **Guide to using drugs, biologics, and other chemicals in aquaculture:** a comprehensive introduction to the legal and judicious use of regulated products in aquaculture and resource for fish culturists and fish health managers. Bethesda: AFS, 2019. Disponível em: <https://fishculture.fisheries.org/working-group-on-aquaculture-drugs-chemicals-biologics/wgadcb-resources-tools/guide-to-using-drugs-biologics-and-other-chemicals-in-aquaculture/>. Acesso em: 26 dez. 2020.
- AMINZARE, M.; ABBASI, Z.; AMIRI, E.; HASHEMI, M.; RAEISI, M.; MOUSAVI, N.; AZAR, H. H. Colibacillosis phytotherapy: an overview on the most important world medicinal plants effective on *Escherichia coli*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 5, p. 629-636, 2017.
- ANASTASIOU, T. I.; MANDALAKIS, M.; KRIGAS, N.; VÉZIGNOL, T.; LAZARI, D.; KATHARIOS, P.; DAILIANIS, T.; ANTONOPOULOU, E. Comparative evaluation of essential oils from medicinal-aromatic plants of Greece: chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity against bacterial fish pathogens. **Molecules**, v. 25, n. 148, 2020.
- ANDERSON, E. T.; STOSKOPF, M. K.; MORRIS, J. A.; CLARKE, E. O.; HARMS, C. A. Hematology, plasma biochemistry, and tissue enzyme activities of invasive red lionfish captured off North Carolina, USA. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, n. 4, p. 266-273, 2010.
- AOKI, T. Motile aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections** London: CABI Publishing, 1999. 3v. p. 427-453.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish.** 6th. ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

AYDINA, B.; BARBAS, L. A. L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: a review. **Aquaculture**, v. 520, 2020.

BAHRAMSOLTANI, R.; ROSTAMIASRABADI, P.; SHAHPIRI, Z.; MARQUES, A. M.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): a review of phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 34-51, 2018.

BAKER, R.; GOBUSH, K. S.; VYNNE, C. H. Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, n. 5, p. 309-318, 2013.

BALDAUF, C.; KUBO, R. R.; SILVA, F.; IRGANG, B. E. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p.282-291, 2009.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DOLESKI, P. H.; VARGAS, A. P. C.; DUARTE, M. M. M. F.; DUARTE, T.; BOLIGON, A. A.; LEAL, D. B. R.; BALDISSEROTTO, B. *Melaleuca alternifolia* essential oil prevents alterations to purinergic enzymes and ameliorates the innate immune response in silver catfish infected with *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 61-66, 2017.

BALDISSEROTTO, B.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MENEZES, C. C.; TONI, C.; PRATI, R. L.; GARCIA, L. O.; SALBEGO, J.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 341-352, 2014.

BANAEI, M.; SUREDA, A.; MIRVAGHEFI, A. R.; RAFEI, G. R. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 885-896, 2011.

BANDEIRA JUNIOR, G.; SUTILI, F. J.; GRESSLER, L. T.; ELY, V. L.; SILVEIRA, B. P.; TASCIA, C.; REGHELIN, M.; MATTER, L. B.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 655-665, 2018.

BARTON, B. A. Stress. In: STICKNEY, R. R. **Encyclopedia of Aquaculture**. New York: John Wiley and Sons, 2000. p. 892-898.

BASSOLS, G. B.; GURNI, A. A. Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular latinoamericana. **Dominguezia**, v. 13, n. 1, p. 7-25, 1996.

BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, p. 338-348, 2013.

BECKER, A. G.; LUZ, R. K.; MATTIOLI, C. C.; NAKAYAMA, C. L.; SILVA, W. S.; LEME, F. O. P.; MENDES, H. C. P. M.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? **Aquaculture**, v. 481, p. 184-190, 2017.

BENOVIT, S. C.; SILVA, L. L.; SALBEGO, J.; LORO, V. L.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E. M. M.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1675-1689, 2015.

BIANCHINI, A. E.; GARLET, Q. I.; CUNHA, J. A.; BANDEIRA JUNIOR, G.; BRUSQUE, I. C. M.; SALBEGO, J.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, p.e6346, 2017.

BILEN, S.; ELBESHTI, H. T. A. G. A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggygria*. **Journal of Fish Diseases**, v. 42, n. 10, p. 1369-1381, 2019.

BOGDANOVIĆ, R.; COBELJIĆ, M.; MARKOVIĆ, M.; NIKOLIĆ, V.; OGNJANOVIĆ, M.; SARJANOVIĆ, L.; MAKIĆ, D. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. **Pediatric Nephrology**, v. 5, n. 3, p.293-295, 1992.

BOTTA, S. M. Las especies Argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 22, n. 1-3, p. 67-108, 1979.

BRASIL. Decreto n.º 5.053, de 22 de abril de 2004. Aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. Poder Executivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 1, 23/4/2004.

BRASIL. Decreto n.º 8.448, de 6 de maio de 2015. Altera o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, aprovado pelo Decreto n.º 5.053, de 22 de abril de 2004. Poder Executivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 2, 7/5/2015.

BRASIL. Decreto n.º 8.840, de 24 de agosto de 2016. Altera o Anexo ao Decreto n.º 5.053, de 22 de abril de 2004, que aprova o Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem. Poder Executivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 2, 25/8/2016.

BRASIL. Decreto-lei n.º 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências. Poder Executivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 1465, 14/2/1969.

BRASIL. Lei n.º 12.689, de 19 de julho de 2012. Altera o Decreto-Lei n.º 467, de 13 de fevereiro de 1969, para estabelecer o medicamento genérico de uso veterinário; e dispõe sobre o registro, a aquisição pelo poder público, a prescrição, a fabricação, o regime econômico-fiscal, a distribuição e a dispensação de medicamentos genéricos de uso veterinário, bem como sobre a promoção de programas de desenvolvimento técnico-científico e de incentivo à cooperação técnica para aferição da qualidade e da eficácia de produtos farmacêuticos de uso veterinário. Poder Legislativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 1, 20/7/2012.

BRASIL. Portaria nº 72, de 2 de junho de 2017. Estabelece, no âmbito do Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os critérios para a priorização de análise de processos de registro e alteração de registro de produtos de uso veterinário. Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS), MAPA. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 9, 07/06/2017.

BUCHER, F. Organ of patterns and natural fluctuations blood enzymes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* RICH.). **Comparative Biochemistry and Physiology: part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 96 B, n. 4, p. 795-799, 1990.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CABELLO, F. C.; GODFREY, H. P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DÖLZ, H.; MILLANAO, A.; BUSCHMANN, A. H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1917-1942, 2013.

CÁCERES, M. S.; SINGER, M. M. El uso de las plantas medicinales en América y en Paraguay. In: **Manual de uso de hierbas medicinales del Paraguay**. Montevideo: Unesco, 2000. p. 11-12.

CAMUS, A. C.; DURBOROW R. M.; HEMSTREET, W. G.; THUNE, R. L.; HAWKE, J. P. Aeromonas bacterial infections: motile aeromonad septicemia. **Southern Regional Aquaculture Center**, United States Department of Agriculture (USDA), publication n. 478, 1998.

CAN, E.; KIZAK, V.; CAN, S. S.; ÖZÇİÇEK, E. Anesthetic potential of geranium (*Pelargonium graveolens*) oil for two cichlid species, *Sciaenochromis fryeri* and *Labidochromis caeruleus*. **Aquaculture**, v. 491, p. 59-64, 2018.

CAN, E.; SÜMER, E. Anesthetic and sedative efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils in blue dolphin cichlid (*Cyrtocara moorii*). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 43, p. 334-341, 2019.

CARMONA, M. D.; LLORACH, R.; OBON, C.; RIVERA, D. “Zahraa”, a Unani multicomponent herbal tea widely consumed in Syria: components of drug mixtures and alleged medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 344-350, 2005.

CEBALLOS, S. J.; PEREA, M. C. Plantas medicinales utilizadas por la comunidad indígena de Quilmes (Tucumán, Argentina). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)**, v. 13, n. 1, p. 47-68, 2014.

CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. United States Department of Health and Human Services (USDA). **Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish: guidance for industry**, n. 150. CVM, 2007. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-150-concerns-related-use-clove-oil-anesthetic-fish>. Acesso em: 24 dez. 2020.

CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. United States Department of Health and Human Services (USDA). **Special considerations, incentives, and programs to support the approval of new animal drugs for minor uses and for minor species:** guidance for industry, n. 61. CVM, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-61-special-considerations-incentives-and-programs-support-approval-new-animal-drugs-minor>. Acesso em: 24 dez. 2020.

CHANSEAU, M. S.; BOSCH, S.; GALIAY, E.; OULES, G. The use of clove oil as an anesthetic for Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) and comparison of its effects with those of 2-phenoxyethanol. **Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture**, v. 75, n. 2-3, p. 579-589, 2002.

CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA R. J.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A. V.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, p. 259-265, 2019.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 445-462, 2008.

CODEX COMMITTEE ON RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS. Codex Alimentarius commission. **Report of the first session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods**. Washington: CCRVDF, p. 27-31, oct. 1986. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee/related-meetings/en/?committee=CCRVDF>. Acesso em: 27 dez. 2020.

COLWELL, R. R.; MACDONELL, M. T.; DE LEY, J. Proposal to Recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA:** anexo da Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018. Brasília: CONCEA, 2018. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf. Acesso em: 23 maio 2020.

CORREIA, A. M.; PEDRAZZANI, A. S.; MENDONÇA, R. C.; MASSUCATTO, A.; OZÓRIO, R. A.; TSUZUKI, M. Y. Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3, p. 436-442, 2018.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L.O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010b.

CUNHA, M. A.; ZEPPENFELD, C. C.; GARCIA, L. O.; LORO, V. L.; FONSECA, M. B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. L.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2107-2114, 2010a.

DALLAIRE-DUFRESNE, S.; TANAKA, K. H.; TRUDEL, M. V.; LAFAILLE, A.; CHARETTE, S. J. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 169 (1-2), p. 1-7, 2014.

DANIEL, A. P.; FERREIRA, L. F.; KLEIN, B.; RUVIARO, A. R.; QUATRIN, A.; PARODI, T. V.; ZEPPENFELD, C. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 560-566, 2016.

DAR, O. I.; SHARMA, S.; SINGH, K.; SHARMA, A.; RENUBHARDWAJ, R.; ARVINDERKAUR, A. Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes. **Chemosphere**, v. 247, first published may 2020.

DELL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina): primera parte, plantas nativas. **Latin American Journal of Natural Resources (Mullequina)**, v. 6, p. 49-66, 1997.

DORIGONI, P. A.; GHEDINI, P. C.; FRÓES, L. F.; BAPTISTA, K. C.; ETHUR, A. B. M.; BALDISSEROTTO, B.; BÜRGER, M. E.; ALMEIDA, C. E.; LOPES, A. M. V.; ZÁCHIA, R. A. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil: relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 1, p. 69-79, 2001.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

EBANI, V. V.; MANCIANTI, F. Use of essential oils in veterinary medicine to combat bacterial and fungal infections. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 193, 2020.

EBANI, V. V.; NARDONI, S.; BERTELLONI, F.; TOSI, G. In Vitro Antimicrobial Activity of essential oils against *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium strains isolated from poultry. **Molecules**, v. 24, n. 900, 2019.

ENDO, T.; OGISHIMA, K.; TANAKA, H.; OHSHIMA, S. Studies of the anesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 38, n. 7, p. 761-767, 1972.

EROVA, T. E.; SHA, J.; HORNEMAN, A. J.; BORCHARDT, M. A.; KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; CHOPRA, A. K. Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 275, n. 2, p. 301-311, 2007.

EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. **Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001**: on the Community code relating to veterinary medicinal products. Official Journal 311, 28/11/2001, p. 0001–0066, 2001. Amended by Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004; Commission Directive 2009/9/EC text with EEA relevance of 10 February 2009; Regulation 470/2009/EC of the European parliament and of the Council of 6 May 2009; Directive 2009/53/EC of the European Parliament and of the Council text with EEA relevance

of 18 June 2009; Regulation 596/2009/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009.

EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. **Regulation 2019/6/EU of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018:** on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. Official Journal 4, 7.1.2019, p. 43-167, 2018.

FAZIO, F.; SAOCA, C.; FERRANTELLI, V.; CAMMILLERI, G.; CAPILLO, G.; PICCIONE, G. Relationship between arsenic accumulation in tissues and hematological parameters in mullet caught in Faro Lake: a preliminary study. **Environmental Science and Pollution Research (international)**, v. 26, n. 9, p. 8821-8827, 2019.

FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. spe, 2003.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, suppl. 2, 2005.

FISHMEDPLUS COALITION. Federation of Veterinarians of Europe. **Fish diseases lacking treatment:** final gap analysis outcome. Brussels, 2017. Disponível em: <https://fve.org/publications/fishmedplus/>. Acesso em: 26 dez. 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. United Nations (ONU). **The state of world fisheries and aquaculture:** meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018.

FUJIMOTO, R. Y.; PEREIRA, D. M.; SILVA, J. C. S.; OLIVEIRA, L. C. A.; INOUE, L. A. K. A.; HAMOY, M.; MELLO, V. J.; TORRES, M. F.; BARBAS, L. A. L. Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 245-256, 2018.

GARLET, Q. I.; PIRES, L. C.; SILVA, D. T.; SPALL, S.; GRESSLER, L. T.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, e4872, 2016.

GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 7, n. 2, p. 288-292, 1987.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GONÇALVES, A. F. N.; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GRESSLER, L. T.; RIFFEL, A. P. K.; PARODI, T. V.; SACCOL, E. M. H.; KOAKOSKI, G.; COSTA, S. T.; PAVANATO, M. A.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B.; SCHMIDT, D.; LLESUY, S. F.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 6, p. 1061-1072, 2014.

GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, S. T.; PARODI, T. V.; PÊS, T. S.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with Propofol. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 463-472, 2015.

GYAWALIA, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HADI, A. A.; SHOKR, A. E.; ALWAN, S. F. Effects of aluminum on the biochemical parameters of fresh water fish, *Tilapia zillii*. **Journal of Science and its Applications**, v. 3, n. 1, p. 33-41, 2009.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 2, p. 354-361, 2010a.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Potential use of probiotic - and triherbal extract - enriched diets to control *Aeromonas hydrophila* infection in carp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 1, p. 41-49, 2010b.

HAYATGHEIB, N.; FOURNEL, C.; CALVEZ, S.; POULIQUEN, H.; MOREAU, E. In vitro antimicrobial effect of various commercial essential oils and their chemical constituents on *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p. 137-145, 2020.

HEINDRICKSON, A.; MERÉTIKA, C.; PERONI, N.; HANAZAKI, N. Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 386-394, 2010.

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

HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anaesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in carp, *Cyprinus carpio*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 2, p. 341-351, 1986.

HILGERT, N. I.; GIL, G. E. Medicinal plants of the Argentine Yungas plants of the Las Yungas biosphere reserve, Northwest of Argentina, used in health care. **Biodiversity & Conservation**, v. 15, n. 8, p. 2565-2594, 2006.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F.; CANTO-DOROW, T. S. Meiotic behavior and pollen viability of *Aloysia gratissima* and *Aloysia triphylla* (Verbenaceae). **Ciência e Natura**, v. 32, n. 1, p. 37-47, 2010.

HOLLOWAY, A. C.; KEENE, J. L.; NOAKES, D. G.; MOCCIA, R. D. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, 2004.

HOSEINI, S. M.; MIRGHAED, A. T.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 550-564, 2019.

JAGRUTHI, C.; YOGESHWARI, G.; ANBAZAHAN, S. M.; MARI, L. S. S.; AROCKIARAJ, J.; MARIAPPAN, P.; SUDHAKAR, G. R. L.; BALASUNDARAM, C.; HARIKRISHNAN, R. Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 674-680, 2014.

JAMILA, F.; MOSTAFA, E. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 76-87, 2014.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1545-1552, 2012.

JERÔNIMO, G. T.; PÁDUA, S. B.; BAMPI, D.; GONÇALVES, E. L. T.; GARCIA, P.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 1000-1006, 2014.

JOHNSON, P. J.; PAULL S. H. The ecology and emergence of diseases in fresh waters. **Freshwater Biology**, v. 56, n. 4, p. 638-657, 2011.

JØRGENSEN, E. H.; HAATUFT, A.; PUVANENDRAN, V.; ATLEMORTENSEN, A. Effects of reduced water exchange rate and oxygen saturation on growth and stress indicators of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in aquaculture. **Aquaculture**, v. 474, p. 26-33, 2017.

KAZUŃ, K.; SIWICKI, A. K. Propiscin: a safe new anaesthetic for fish. **Archives of Polish Fisheries**, v. 20, p. 173-177, 2012.

KIM, K.; KIM, A. R.; CHO, E.; JOO, S.; PARK, J.; MOON, J.; YUM, J.; KIM, T. H.; KWON, H.; LEE, H.; KIM, Y.; LEE, E. Antibacterial Activity of *Rhus javanica* against the Fish Pathogens *Vibrio ichthyoenteri* and *Streptococcus iniae*. **Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 1, p. 18-22, 2014.

KIROV, S. M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 265-287.

KONDERA, E.; TEODORCZUK, B.; LUGOWSKA, K.; WITESKA, M. Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 1011-1018, 2018.

KŘIŠT'AN, J.; STARÁ, A.; TUREK, J.; POLICAR, T.; VELÍŠEK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.). **Neuroendocrinology Letters**, v. 33, n. 3, p. 66-71, 2012.

LEPIC, P.; STARÁ, A.; TUREK, J.; KOZÁK, P.; VELÍŠEK, J. The effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in vimba bream, *Vimba vimba*. **Veterinární medicína**, v. 59, n. 2, p. 81-87, 2014.

LU, J.; LU, H.; CAO, G. Hematological and histological changes in prussian carp *Carassius gibelio* infected with cyprinid herpesvirus 2. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 28, n. 3, p.150-160, 2016.

MAFFEI, B. R. A. Drogas vegetales indígenas. In: **Plantas medicinales**. Montevideo: Nuestra Tierra, 1969. p. 11-12.

MAIA, E. A.; FRANCISCO, J.; PIRES, T.; MANFREDI-COIMBRA, S. O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades da Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 54-74, 2011.

MARKING, L. L. Toxicity of MS-222 to selected fishes. **Investigations in Fish Control**, n. 12, p. 1-10, 1967.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, n. 6, p. 2-5, 1985.

MATHIAS, F. T.; FOCKINK, D. H.; DISNER, G. R.; PRODOCIMO, V.; RIBAS, J. L. C.; RAMOS, L. P.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 105-113, 2018.

MATTSON, N. S.; RIPPLE, T. H. Metomidate: a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture**, v. 83, n. 1-2, p. 89-94, 1989.

MBOKANE, E. M.; MOYO, N. A. G. Alterations of haemato-biochemical parameters pre and post-challenge with *Aeromonas hydrophila* and survival of *Oreochromis mossambicus* fed *Moringa oleifera*-based diets. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 83, p. 213-222, 2018.

MC'FARLAND, W. N. A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Publications of the Institute of Marine Science**, University of Texas, v. 6, p. 23-55, 1959.

MERÉTIKA, A. H. C.; PERONI, N.; HANAZAKI, N. Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2; p. 386-394, 2010.

METIN, S.; DIDINEN, B. I.; KUBILAY, A.; PALA, M.; AKER, İ. Determination of anesthetic effects of some medicinal plants on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). **Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research**, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2015.

MILLER, R. A.; HARBOTTLE, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 1, 2017.

- MONIR, M. S.; YUSOFF, S. M.; MOHAMAD, A.; INA-SALWANY, M. Y. Vaccination of tilapia against motile aeromonas septicemia: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 32, n. 2, p. 65-76, 2020.
- MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. Introdução aos princípios de fisiologia (cap.1). In: **Princípios de fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
- MUSA, N.; WEI, L. S.; SHAHAROM, F.; WEE, W. Surveillance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium shop. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 6, p. 903-905, 2007.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.
- NELSON, P. R. Use of Three Anesthetics on Juvenile Salmon and Trout. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 15, n. 2, p. 74, 1953.
- NGUGI, C. C.; OYOO-OKOTH, E.; MUGO-BUNDI, J.; ORINA, P. S.; CHEMOIWA, E. J.; ALOO, P. A. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult victoria labeo (*Labeo victorinus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 533-541, 2015.
- O'LEARY, N.; LU-IRVING, P.; MORONI, P.; SIEDO, S. Taxonomic revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae) in South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 101, n. 3, p. 568-609, 2016.
- OLESEN, N. J.; VENDRAMIN, N. Overview of the disease situation and surveillance in Europe in 2015. In: **20th Annual workshop of the National Reference Laboratories for fish diseases**. Copenhagen: National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, 2016. p. 13-15.
- OLIVA, M. M.; BELTRAMINO, E.; GALLUCCI, N.; CASERO, C.; ZYGADLO, J.; DEMO, M. Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)**, v. 9, n. 1, p. 29-37, 2009.
- OLIVA, M. M.; CAREZZANO, E.; GALLUCCI, N.; FREYTES, S.; ZYGADLO, J. A.; DEMO, M. Growth inhibition and morphological alterations of *Staphylococcus aureus* caused by the essential oil of *Aloysia triphylla*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)**, v. 14, n. 2, p. 83-91, 2015.
- ORSI, R. O.; SANTOS, V. G.; PEZZATO, L. E.; CARVALHO, P. L. P. F.; TEIXEIRA, C. P.; FREITAS, J. M. A.; PADOVANI, C. R.; SARTORI, M. M. P.; BARROS, M. M. Activity of Brazilian propolis against *Aeromonas hydrophila* and its effect on Nile tilapia growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1785-1799, 2017.
- OUKERROU, M. A.; TILAOU, M.; MOUSE, H. A.; LEOUIFOUDI, I.; JAAFARI, A.; ZYAD, A. Chemical composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of *Aloysia citriodora* Palau grown in Morocco. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2017, article ID 7801924, 10p., 2017.

- PARK, J.; WENDT, M.; HEO, G. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. **Laboratory Animal Research**, v. 32, n. 2, p. 87-90, 2016.
- PARODI, T. V.; CUNHA, M. A.; BECKER, A. G.; ZEPPENFELD, C. C.; MARTINS, D. I.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. J. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 323-334, 2014.
- PARODI, T. V.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. L.; BECKER, A. G.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* under seasonal influence and its anaesthetic activity in fish. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 6, p. 2515-2524, 2020.
- PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário Peixe BR da piscicultura 2020**. Pinheiros, SP: Peixe BR, 2020. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>. Acesso em: 26 dez. 2020.
- PEKALA-SAFIŃSKA, A. Contemporary Threats of Bacterial Infections in Freshwater Fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 261-267, 2018.
- PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M. I.; RITTER, F.; SILVA, L. B. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1057-1063, 2006.
- PÊS, T. S.; SACCOL, E. M. H.; OURIQUE, G. M.; LONDERO, E. P.; GRESSLER, L. T.; FINAMOR, I. A.; ROTILI, D. A.; GOLOMBIESKI, J. I.; GLANZNER, W. G.; LLESUY, S. F.; GONÇALVES, P. B. D.; NETO, J. R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 321-323, 2016.
- POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas*. Kluver and Van Niel 1936, 398 AL. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. J. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. sec. 5. 9th ed. London: Williams and Wilkins, 1984. 1v. p. 545-547.
- PŘÍBORSKÝ, J.; STARÁ, A.; REZABEK, J.; ZUSKOVÁ, E.; LEPIC, P.; VELÍŠĚK, J. Comparison of the effect of four anaesthetics on haematological profiles, oxidative stress and antioxidant enzymes in barbel (*Barbus barbus*). **Neuroendocrinology Letters**, v. 36, n. 1, p. 141-146, 2015.
- PŘÍBORSKÝ, J.; VELÍŠĚK, J. A review of three commonly used fish anesthetics. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 4, p. 417-442, 2018.
- PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews**, v. 7, n. 48, 2012.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica de peixes**. Maringá: Eduem, 2013.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 73, n. 9, p. 2085-2090, 2009.

RIBAS, J. L. C.; ZAMPRONIO, A. R.; ASSIS, H. C. S. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 975-982, 2016.

RICCIARDI, G.; TORRES, A. M.; BUBENIK, A. L.; RICCIARDI, A.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Environmental effect on essential oil composition of *Aloysia citriodora* from Corrientes (Argentina). **Natural Product Communications**, v. 6, n. 11, p. 1711-1714, 2011.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no Município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

ROBSON, W. L.; LEUNG, A. K.; TREVENEN, C. L. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis (Comment). **Pediatric Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 221, 1992.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd. ed. Oxford: Blackwell Science, 2008.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

SACCOL, E. M. H.; UCZAY, J.; PÊS, T. S.; FINAMOR, I. A.; OURIQUE, G. M.; RIFFEL, A. P. K.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; LLESUY, S. F.; LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

SAHARIA, P. K.; HUSSAIN, I. A.; POKHREL, H.; KALITA, B.; BORAH, G.; YASMIN, R. Prevalence of motile aeromonas septicaemia (MAS) in fish culture systems of the Central Brahmaputra Valley Zone of Assam, India. **Aquaculture Research**, first published: 03 November 2020.

SAINT-HILAIRE, A. **Flora Brasiliae meridionalis: Tomus Primus. Parisiis**, Paris, França: Apud A. Belin Bibliopolam, iv, 167 p., il., 34 cm, 1825. Disponível em: http://acervo.bndigital.bn.br/sophia/index.asp?codigo_sophia=36430. Acesso em: 02 nov. 2020.

SAINT-HILAIRE, A. **História das plantas mais notáveis do Brasil e do Paraguai**. Tradução Cleonice Paes Barreto Mourão. Belo Horizonte: Fino Traço, 2011. 376p. Tradução de "Histoire des Plantes les plus remarquables du Brésil et Du Paraguay" de 1824. Disponível em: <http://www.ceplamt.org.br/wp-content/uploads/2014/02/HistoriaPlantas-SaintHilaire-PROVA-5aCorrecao.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2020.

SAINTH-ILAIRE, A.; JUSSIEU, A.; CAMBESSEDES, J. *Flora Brasiliae Meridionalis: Tomus Secundus. Parisiis*, Paris: Apud A. Belin Bibliopolam, Via Dicta des Mathurins S.-J., n. 14, 1829. Disponível em: https://play.google.com/books/reader?id=vtDSeahp_J8C&hl=pt_BR&pg=GBS.PA3. Acesso em: 02 nov. 2020.

SAINTH-ILAIRE, A.; JUSSIEU, A.; CAMBESSEDES, J. *Flora Brasiliae Meridionalis: Tomus Tertius. Parisiis*, Paris: Apud A. Belin Bibliopolam, Via Dicta Sainte-Anne, n. 55, 1832. Disponível em: https://play.google.com/books/reader?id=eatLAAAAYAAJ&hl=pt_BR&pg=GBS.PP9. Acesso em: 02 nov. 2020.

SALEHI, M. R.; SHADVAR, S.; SADEGHIAN, M.; DOOMANLOU, M.; ABDOLLAHI, A.; MANSHADI, S. A. D.; SARDARI, A.; RAHDAR, H. S.; FEIZABADI, M. M. Endocarditis with *Aeromonas salmonicida*. **IDCases**, v. 18, e00625, 2019.

SANTOS, A. C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, T. S.; SILVA, M. A. P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, supl. 2, p. 980-991, 2015.

SANTOS, A. C.; BANDEIRA JUNIOR, G.; ZAGO, D. C.; ZEPPENFELD, C. C.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M. A. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, n. 1, p. 106-113, 2017.

SANTOS, A. C.; CUNHA, M. A. International legislation on drugs and biological products used in the sanitary management of aquatic animals. In: KIBENGE, F. S. B.; BALDISSEROTTO, B.; CHONG, R. S. **Aquaculture Pharmacology**. London: Academic Press, 2021. p. 348-390.

SANTOS-GOMES, P. C.; FERNANDES-FERREIRA, M.; VICENTE, A. M. S. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] Grown in Portugal. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, p. 73-78, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, A. M. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. **Investigations in Fish Control**, n. 13, p. 1-15, 1967.

SCHOETTGER, R. A.; JULIN, A. M. Efficacy of Quinaldine as an anaesthetic for seven species of fish. **Investigations in Fish Control**, n. 22, p. 1-10, 1969.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Aquicultura no Brasil**. Brasília: SEBRAE, 2015.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. PhD Thesis (Biology) – Department of Zoology (Stockholm University). Swedish Museum of Natural History, 1996.

SILVA, L. L.; BALCONI, L. S.; GRESSLER, L. T.; GARLET, Q. I.; SUTILI, F. J.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B.; MOREL, A. F.; HEINZMANN, B. M. S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-*Aeromonas hydrophila* activity and anesthetic properties in fish. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 203-212, 2017.

SILVA, L. L.; GARLET, Q. I.; BENOVI, S. C.; DOLCI, G.; MALMANN, C. A.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; HEINZMANN, B. M. Sedative and anesthetic activities of the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. and their isolated components in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 9, p. 771-779, 2013a.

SILVA, L. L.; PARODI, T. V.; RECKZIEGEL, P.; GARCIA, V. O.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALMANN, C. A.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013b.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de produtos veterinários**. Brasília: SINDAN, 2021. Disponível em: <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/pesquisar.aspx>. Acesso em: 05 jan. 2021.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 177-185, 2003.

SOTO, C. G.; BURHANUDDIN, S. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, v. 136, n. 1-2, p. 149-152, 1995.

SOUSA, D. G.; SOUSA, S. D. G.; SILVA, R. E. R.; SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DASILVA, F. W.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A.; LEAL-CARDOSO, J. H.; BARBOSA, R. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 697-702, 2015.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; VAUCHER, R. A.; LOPES, L. Q. S.; VIZZOTTO, B. S.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V.; VEIGA, M. L.; ROCHA, M. I. U. M.; STEFANI, L. M.; BALDISSEROTTO, B. In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 82-87, 2016.

SOUZA, C. F.; BIANCHINI, A. E.; SILVA, E. G.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F.; SCHMIDT, D.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 21-34, 2018.

- SOUZA, C. F.; DESCOVI, S.; BALDISSERA, M. D.; BERTOLIN, K.; BIANCHINI, A. E.; MOURÃO, R. H. V.; SCHMIDT, D.; HEINZMANN, B. M.; ANTONIAZZI, A.; BALDISSEROTTO, B.; MARTINEZ-RODRÍGUEZ, G. Involvement of HPI-axis in anesthesia with *Lippia alba* essential oil citral and linalool chemotypes: gene expression. in the secondary responses in silver catfish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 155-166, 2019.
- 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. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 4, p. 707-714, 2015.
- SOUZA, R. C.; COSTA, M. M.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; COPATTI, C. E. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 29-33, 2017.
- STEIBEL, P.E. Las Verbenáceas (*Verbenaceae* J. St.-Hil.) de la Provincia de La Pampa, Argentina. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 11, n. 1, p. 1-30, 2000.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2nd. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
- STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. An overview of motile *Aeromonas* septicaemia management. **Aquaculture International**, v. 25, p. 1095-1105, 2017.
- SUTILI, F. J.; MURARI, A. L.; SILVA, L. L.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. P. C.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. The use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus* sp. in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 82-88, 2016.
- SUTILI, F. J.; SILVA, L. L.; GRESSLER, L. T.; GRESSLER, L. T.; BATTISTI, E. K.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. P. C.; BALDISSEROTTO, B. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: in vitro activity and their use in experimentally infected fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 47-54, 2015.
- TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV: variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p.693-698, 2002.
- TEIXEIRA, R. R.; SOUZA, R. C.; SENA, A. C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; COUTO, R. D.; COPATTI, C. E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 7, p. 3383-3392, 2017.
- THRALL, M. A. Hematologia de peixes. In: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 265-276.
- TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, ID 256261, 2012.

TRICAINE-S: tricaine methanesulfonate. Ferndale: Western Chemical, 1997. Product label.

UNITED STATES. **Animal Drug Availability Act, 1996:** to amend the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act to provide for improvements Oct. 9, 1996 in the process of approving and using animal drugs, and for other purposes. Public Law 104-250, 104th Congress, 1996.

UNITED STATES. **Federal Food, Drug and Cosmetic Act.** United States Code, Title 21 (Food and Drugs), Chapter 9 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act), 1938 Disponível em: <https://uscode.house.gov/browse/prelim@title21/chapter9&edition=prelim>. Acesso em: 13 jan. 2020.

UNITED STATES. **Minor Use and Minor Species Animal Health Act of 2004:** to amend the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act with regard to new animal drugs, and for other purposes. United States Electronic Code of Federal Regulations (*eCFR*), Part 516, New Animal Drugs for Minor Use and Minor Species, Title 21(Food and Drugs), Chapter I (Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter E (Animal Drugs, Feeds, and Related Products)). 108th Congress, Public Law 108-282, 08/02/2004.

VALDERRAMA, K.; SOTO-DÁVILA, M.; SEGOVIA, C.; VÁSQUEZ, I.; DANG, M.; SANTANDER, J. *Aeromonas salmonicida* infects Atlantic salmon (*Salmo salar*) erythrocytes. **Journal of Fishes Diseases**, v. 42, n. 11, p. 1601-1608, 2019.

VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS-JR, J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 70-714, 2002.

VELÍŠEK, J.; STARÁ, A.; LI, Z.; SILOVSKÁ, S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 310, n. 3-4, p. 369-375, 2011.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 73, p. 247-252, 2004.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIAČKOVÁ, V. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on haematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 76, p. 487-492, 2007.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIAČKOVÁ, V. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 74, p. 139-146, 2005.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIAČKOVÁ, V.; GROCH, L.; NEPEJCHALOVÁ, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinární Medicína**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheat-fish (*Silurus glanis* L.). **Veterinární Medicína**, v. 52, n. 3, p. 103-110, 2007.

VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L.; ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 75, p. 99-106, 2006.

WAGNER, T.; CONGLETON, J. L. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 7, p. 1066-1074, 2004.

WATERSTRAT, P. R. Induction and recovery from anaesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, n. 2, p. 250-255, 1999.

WEIL, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 147-152, 2013.

WINGSTRAND, K. G. Non-nucleated erythrocytes in a teleostean fish *Maurolicus mulleri* (GMELIN). **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 45, p. 195-200, 1956.

WITESKA, M.; DUDYK, J.; JARKIEWICZ, N. Haematological effects of 2-phenoxyethanol and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 42, n. 5, p. 537-546, 2015.

WOODY, C. A.; NELLSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.

XU, N.; LI, M.; CHOU, W.; LIN, Z. A physiologically based pharmacokinetic model of doxycycline for predicting tissue residues and withdrawal intervals in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, first published March 2020.

YONAR, M. E.; YONAR, S. M.; İSPIR, Ü.; URAL, M. Ş. Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 89, p. 83-90, 2019.

YU, W.; WEN, G.; LIN, H.; YANG, Y.; HUANG, X.; ZHOU, C.; ZHANG, Z.; DUAN, Y.; HUANG, Z.; LI, T. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of coral trout *Plectropomus leopardos* (Lacepede, 1802). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 74, p. 649-655, 2018.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 201-218, 2012.

ZEPPENFELD, C. C.; BRASIL, M. T. B.; CAVALCANTE, G.; SILVA, L. V. F.; MOURÃO, R. H.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction of juveniles of *Rhamdia quelen* and *Ctenopharyngodon idella* with *Ocimum micranthum* essential oil. **Ciência Rural**, v. 49, e20180218, 2019.

ZEPPENFELD, C. C.; HERNÁNDEZ, D. R.; SANTINÓN, J. J.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A.; SCHMIDT, D.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 933-940, 2016.

ZEPPENFELD, C. C.; SACCOL, E. M. H.; PÊS, T. S.; SALBEGO, J.; KOAKOSKI, G.; SANTOS, A.C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A.; BARCELLOS, L. J. G.; PAVANATO, M. A.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*: Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1362-1367, 2017.

ZEPPENFELD, C. C.; TONI, C.; BECKER, A. G.; MIRON, D. S.; PARODI, T. V.; HEINZMANN, B. M.; BARCELLOS, L. J. G.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J. G. S.; LORO, V. L.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418-419, p. 101-107, 2014.

ZHAO, Y.; ZHANG, L.; WANG, C.; XIE, C. Biology and ecology of grass carp in China: a review and synthesis. **North American Journal of Fisheries Management**, first published: 26 august 2020.