

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

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE SEDATIVA E
ANESTÉSICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia
gratissima* (GILLIES & HOOK.) TRONCOSO
(VERBENACEAE) EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*).**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Simone Cristina Benovit

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE SEDATIVA E ANESTÉSICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia gratissima* (GILLIES & HOOK)
TRONCOSO (VERBENACEAE) EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*).**

Simone Cristina Benovit

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE SEDATIVA E ANESTÉSICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Aloysia gratissima* (GILLIES & HOOK.) TRONCOSO
(VERBENACEAE) EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*).**

elaborada por
Simone Cristina Benovit

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Berta Maria Heinzmann, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

**Stela Maris Kuze Rates, Dr^a.
(UFRGS)**

**Mauro Alves da Cunha, Dr.
(UFSM)**

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), particularmente ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À professora Berta M. Heinzmann que me proporcionou os primeiros ensinamentos na área científica, pela compreensão, amizade e orientação no desenvolvimento da dissertação;

Ao professor Bernardo Baldisserotto pela coorientação valiosa, conhecimentos transmitidos e por todo apoio durante o mestrado;

Aos professores Carlos A. Mallmann, Érico M. M. Flores, Solon J. Longhi, Marcos Sobral, Vânia L. Loro, Marilise E. Bürger e demais professores do PPG em farmacologia pela disponibilidade e ensinamentos;

Aos meus pais Lurdes M. de Oliveira e Eldor R. Benovit, em especial a minha mãe, que nunca mediu esforços em me apoiar e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis;

Ao meu namorado e grande companheiro Magno G. Bombassaro, por fazer parte da minha vida e dessa conquista, sempre com incentivo, apoio e compreensão;

À Lenise, minha grande amiga e companheira de laboratório, por toda ajuda prestada, pelos momentos de discussões científicas que enriqueceram o trabalho realizado, e pelas junções e momentos de descontração juntamente com Viviane e Clarissa;

Ao pessoal do Laboratório de Extrativos Vegetais: Lenise, Juliana, Cassiela, Theodoro, Bianca, Daniela, Quelen, Dianni, Lúcio e Carlos pela colaboração, amizade e momentos de descontração entre um trabalho e outro;

Ao pessoal do LAFIPE pela amizade e esclarecimentos relacionados ao universo dos peixes.

Aos grandes amigos pelo apoio e compreensão, pelos mates, junções e momentos de alegria;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Se um dia você tiver que escolher entre o amor e o mundo,
lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas
se escolher o amor, com ele conquistará o mundo”*

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE SEDATIVA E ANESTÉSICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia gratissima* (GILLIES & HOOK.) TRONCOSO (VERBENACEAE) EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*).

Autora: Simone Cristina Benovit

Orientadora: Berta Maria Heinzmann

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de fevereiro de 2012.

Este trabalho foi desenvolvido visando isolar os compostos ativos responsáveis pela atividade anestésica detectada para o óleo essencial de *Aloysia gratissima* (OEA) em jundiás (*Rhamdia quelen*). A atividade da acetilcolinesterase (AChE) sob a influência do OEA também foi investigada. Jundiás foram submetidos a banho de anestesia com OEA (90, 300, 450 ou 900 mg L⁻¹), suas frações e compostos isolados, a fim de determinar o tempo de indução e recuperação anestésica. Eugenol (50 mg L⁻¹) foi utilizado como controle positivo. OEA foi eficaz como anestésico nas concentrações de 300 a 900 mg L⁻¹. No entanto, os jundiás apresentaram contrações musculares involuntárias durante a indução e recuperação. Atividade da AChE não foi alterada pelo OEA. O fracionamento bio-guiado do OEA forneceu *E*-(-)-pinocafona, (-)-óxido de cariofileno, (-)-guaíol e (+)-espatulenol, os quais foram identificados por espectrometria de massas (EM), ¹H e ¹³C-RMN. *E*-(-)-pinocafona causou os mesmos efeitos adversos observados para o OEA. (-)-Óxido de cariofileno, (-)-guaíol e (+)-espatulenol apresentaram apenas efeitos sedativos em concentrações proporcionais às dos constituintes no OEA. (-)-Óxido de cariofileno também foi sedativo em maior concentração (40 mg L⁻¹) que a presente no OEA, enquanto (+)-espatulenol (51,2 mg L⁻¹) promoveu anestesia profunda, sem efeitos adversos. OEA apresentou propriedades anestésicas, no entanto, deve ser utilizado com cuidado em jundiás devido aos efeitos adversos observados. Uma maior concentração de (+)-espatulenol, e menor quantidade ou ausência de *E*-(-)-pinocafona poderiam contribuir para melhorar a atividade do OE de *A. gratissima*. (+)-Espatulenol apresentou potente atividade sedativa e anestésica em jundiás, e pode ser considerado um composto anestésico promissor.

Palavras-chave: anestesia, *E*-(-)-pinocanfona, (-)-óxido de cariofileno, (-)-guaíol, (+)-espatulenol.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

COMPOSITION, SEDATIVE AND ANESTHETIC ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Aloysia gratissima* (GILLIES & HOOK.) TRONCOSO (VERBENACEAE) IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)

Author: Simone Cristina Benovit

Advisor: Berta Maria Heinzmann

Date and Place of Defense: February 23, 2012, Santa Maria

This work was designed to isolate the active compounds responsible for the central activity detected for the essential oil of *Aloysia gratissima* (EOA) in silver catfish (*Rhamdia quelen*). The AChE (acetylcholinesterase) activity under the influence of EOA was also investigated. Silver catfish were submitted to anesthesia bath with EOA (90, 300, 450 or 900 mg L⁻¹), their fractions and isolated compounds to determine time of anesthetic induction and recovery. Eugenol (50 mg L⁻¹) was used as positive control. EOA was effective as anesthetic at concentrations of 300 to 900 mg L⁻¹. However, silver catfish presented involuntary muscle contractions during induction and recovery. AChE activity was not inhibited by EOA. The bio-guided fractionation of EOA furnished *E*-(-)-pinocamphone, (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaiol and (+)-spathulenol, which were identified by mass spectrometry (MS), ¹H- and ¹³C-NMR. *E*-(-)-pinocamphone caused the same side effects observed to the EOA. (-)-Caryophyllene oxide, (-)-guaiol and (+)-spathulenol showed only sedative effects at concentrations proportional to those of the constituents in EOA. (-)-Caryophyllene oxide was also sedative in higher concentration (40 mg L⁻¹) than present in EOA while (+)-spathulenol (51.2 mg L⁻¹) promoted deep anesthesia without side effects. EOA showed anesthetic properties, however, should be used with caution in silver catfish due to observed side effects. A higher concentration of (+)-spathulenol, and lower or absent amounts of *E*-(-)-pinocamphone could contribute to improve the activity of the EO of *A. gratissima*. (+)-Spathulenol showed potent sedative and anesthetic activities in silver catfish, and could be considered as a promising anesthetic compound.

Keywords: anesthesia, *E*-(-)-pinocamphone, (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaiol, (+)-spathulenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso. A: Imagem obtida no local de coleta, Morro Cechella, Santa Maria-RS em 13 de abril de 2010. B: Exsicata. 18

MANUSCRITO

Figure 1. Time required for the induction and recovery from sedation in silver catfish submitted to EOA and the isolated compounds at proportional concentrations to those of the constituents in EOA.....51

Figure 2: Time required for the induction of sedation and anesthesia in silver catfish submitted to (+) spathulenol (51.20 mg L^{-1}) in comparison with eugenol (50 mg L^{-1}).....53

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Estágios de anestesia em peixes..... | 22 |
|--|----|

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| Table 1: Chemical composition of essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> | 46 |
| Table 2: Time (s) required for anesthesia induction and recovery using different concentrations of EOA in <i>Rhamdia quelen</i> | 48 |
| Table 3: Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to EOA. | 49 |
| Table 4: Major constituents of the fractions of higher yield obtained from EOA..... | 49 |
| Table 5: Time (s) required for induction and recovery from anesthesia using EOA (at concentration of 450 mg L^{-1}) and its fractions of higher yield (at proportional concentrations to those of the major constituents in the EOA) in <i>Rhamdia quelen</i> | 50 |
| Table 6: Regression equations related to the time required for the induction and recovery from anesthesia using (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaiol and (+)-spathulenol in silver catfish juveniles..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| ACTH | Hormônio adenocorticotrófico |
| BDZ | Benzodiazepínico |
| CL | Concentração letal |
| EM | Espectrometria de massas |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HLC | Hormônio liberador de corticotropina |
| HPI | Hipotalâmico-pituitária-interrenal |
| MS-222 | Metanossulfonato de tricaína |
| OEA | Óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> |

MANUSCRITO

| | |
|------|--|
| AChE | Acetylcholiesterase |
| CC | Column chromatography |
| EO | Essential oil |
| EOA | Essential oil of <i>Aloysia gratissima</i> |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid |
| MS | Mass spectrometry |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| SEM | Standard error of mean |
| TLC | Thin layer chromatography |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO 1. Cromatograma do óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook.) Troncoso..... | 66 |
| ANEXO 2. Espectro de massas da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (NIST, 2002)..... | 67 |
| ANEXO 3. Espectro de RMN ¹ H da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl ₃)..... | 68 |
| ANEXO 4. Ampliação do espectro de RMN ¹ H da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl ₃).... | 69 |
| ANEXO 5. Ampliação do espectro de RMN ¹ H da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl ₃).... | 70 |
| ANEXO 6. Espectro de RMN ¹³ C da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (100 MHz, CDCl ₃)..... | 71 |
| ANEXO 7. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT da <i>E</i> -(-)-pinocanfona (100 MHz, CDCl ₃). | 72 |
| ANEXO 8. Espectro de massas do (-)-óxido de cariofileno (NIST, 2002)..... | 73 |
| ANEXO 9. Espectro de RMN ¹ H do (-)-óxido de cariofileno (400 MHz, CDCl ₃)..... | 74 |
| ANEXO 10. Ampliação do espectro de RMN ¹ H do (-)-óxido de cariofileno (400 MHz, CDCl ₃). | 75 |
| ANEXO 11. Espectro de RMN ¹³ C do (-)-óxido de cariofileno (100 MHz, CDCl ₃)..... | 76 |
| ANEXO 12. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT do (-)-óxido de cariofileno (100 MHz, CDCl ₃). .. | 77 |
| ANEXO 13. Espectro de massas do (-)-guaíol (NIST, 2002). | 78 |
| ANEXO 14. Espectro de RMN ¹ H do (-)-guaíol (400 MHz, CDCl ₃). | 79 |
| ANEXO 15. Ampliação do espectro de RMN ¹ H do (-)-guaíol (400 MHz, CDCl ₃). | 80 |
| ANEXO 16. Espectro de RMN ¹³ C do (-)-guaíol (100 MHz, CDCl ₃)..... | 81 |
| ANEXO 17. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT do (-)-guaíol (100 MHz, CDCl ₃)..... | 82 |
| ANEXO 18. Espectro de massas do (+)-espatulenol (NIST, 2002). | 83 |
| ANEXO 19. Espectro de RMN ¹ H do (+)-espatulenol (400 MHz, CDCl ₃). | 84 |
| ANEXO 20. Ampliação do espectro de RMN ¹ H do (+)-espatulenol (400 MHz, CDCl ₃). | 85 |
| ANEXO 21. Espectro de RMN ¹³ C do (+)-espatulenol (100 MHz, CDCl ₃)..... | 86 |
| ANEXO 22. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT do (+)-espatulenol (100 MHz, CDCl ₃)..... | 87 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 APRESENTAÇÃO..... | 12 |
| 2 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 15 |
| 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 5.1 O gênero <i>Aloysia</i> | 16 |
| 5.1.1 <i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook) Troncoso..... | 18 |
| 5.2 Atividade anestésica geral em peixes | 20 |
| 5.2.1 Anestésicos de origem sintética..... | 23 |
| 5.2.2 Anestésicos de origem natural..... | 24 |
| 6 MANUSCRITO..... | 26 |
| Abstract..... | 27 |
| Introduction | 28 |
| Materials and Methods | 28 |
| Results | 33 |
| Discussion..... | 35 |
| Conclusion..... | 38 |
| Acknowledgements | 39 |
| References | 40 |
| 7 CONCLUSÕES | 54 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é apresentada da seguinte forma: INTRODUÇÃO, OBJETIVO GERAL, OBJETIVOS ESPECÍFICOS, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, RESULTADOS, CONCLUSÕES E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de MANUSCRITO, este está formatado conforme o periódico científico BioMed Research International, ao qual foi submetido. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas são encontradas no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se às citações, as quais aparecem nos itens INTRODUÇÃO, MANUSCRITO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma infinidade de compostos com diferentes características e ações biológicas e, dessa forma, podem ser a base para a obtenção de novas moléculas ativas, potencialmente úteis na clínica ou até mesmo servir de protótipos para a produção de substâncias sintéticas (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Alguns compostos naturais ainda possuem ampla aplicação na medicina moderna, entre estes podem ser destacados a morfina e o paclitaxel (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Para avaliação farmacológica de espécies vegetais, é muito importante a seleção da planta, a qual pode ser feita tendo como base a utilização desta na medicina tradicional, ou seja, partindo dos conhecimentos etnofarmacológicos. Outros critérios que podem ser levados em consideração são as informações botânico-taxonômicas, quimiotaxonômicas e ecológicas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; PATWARDHAN, 2005; BALUNAS e KINGHORN, 2005).

No Brasil, é crescente o emprego de plantas medicinais sem comprovação científica de suas propriedades farmacológicas, baseando-se apenas em informações de comerciantes, os quais não têm formação suficiente para dar orientação quanto à utilização correta. Assim, é comum a ocorrência de efeitos adversos com a utilização de espécies medicinais, bem como a interação com outros fármacos. Dessa forma, é preciso muita atenção com plantas que contenham substâncias agressivas, a fim de evitar possíveis intoxicações (VEIGA et al., 2005).

Entre os diferentes metabólitos secundários presentes em algumas espécies vegetais, encontram-se os óleos essenciais, geralmente formados por uma complexa mistura de compostos de baixo peso molecular e voláteis, caracterizada por um odor intenso. Em relação à composição química, a maioria dos óleos essenciais é constituída por derivados fenilpropanóides ou terpenóides. Estes óleos ou seus compostos isolados são muito utilizados na indústria de alimentos, cosmética, perfumaria e aromaterapia; adicionalmente, podem apresentar diferentes atividades biológicas (BAKKALI et al., 2008).

Entre as diferentes propriedades já descritas para óleos essenciais podem ser destacadas atividade anticâncer, sedativa, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, anestésica local, espasmolítica, repelente de insetos, entre outras (BAKKALI et al., 2008; ADORJAN e BUCHBAUER, 2010; DOBETSBERGER e BUCHBAUER, 2011).

Além de avaliar a potencial atividade farmacológica ou toxicidade dos óleos essenciais, estudos relacionados ao isolamento das prováveis substâncias ativas ou tóxicas também são de grande importância, uma vez que, ao correlacionar os efeitos com determinadas substâncias, torna-se possível a determinação de padrões de qualidade e segurança para utilização destes compostos voláteis na terapêutica (MECKES; CALZADA, 1996; HÖLD et al., 2000; LIAPI et al., 2007; DAR et al., 2011).

Por outro lado, existem estudos demonstrando que o fracionamento ou isolamento dos constituintes pode resultar em diminuição ou até mesmo perda da atividade, o que indica uma potencial relação de sinergismo entre as substâncias (GALINDO et al., 2010; SAVELEV et al., 2004). O sinergismo pode ocorrer devido à soma dos mecanismos de ação apresentados pelas diferentes substâncias presentes em óleos essenciais, chamado de sinergismo farmacodinâmico, ou também quando um constituinte interfere com a atividade do outro melhorando sua absorção, distribuição, biotransformação ou eliminação, representando o sinergismo farmacocinético (HARRIS, 2002; SPINELLA, 2002).

A espécie *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso, pertencente à família das Verbenaceae, conhecida popularmente como erva-santa, garupá, entre outros (SOUZA e WIEST, 2007), é empregada na medicina popular devido a diversas propriedades, entre estas pode ser destacada sua utilização como sedativa (GOLENIOWSKI et al., 2006). Entre as diferentes atividades biológicas publicadas para referida espécie vegetal, pode ser enfatizada a atividade antidepressiva do seu extrato aquoso em camundongos (ZENI et al., 2011), demonstrando a sua potencial atividade sobre o sistema nervoso central. Na literatura, até o momento, não existem trabalhos publicados sobre a atividade anestésica dessa espécie vegetal. Neste trabalho foi utilizada a espécie *Rhamdia quelen*, jundiá, como animal de experimentação. Esta espécie apresenta distribuição comum no sul do Brasil, é aceita comercialmente e muito apreciada nesta região (CUNHA, 2007). Estudos demonstram que os óleos essenciais de *Lippia alba* (CUNHA et al., 2010a) e *Ocimum gratissimum* (SILVA et al., 2012), bem como o eugenol (CUNHA et al., 2010b), apresentaram atividade anestésica para esta espécie de peixe.

O isolamento dos constituintes de *A. gratissima* e a avaliação do seu potencial anestésico em peixes podem contribuir para obtenção de compostos biologicamente ativos de interesse para a piscicultura, bem como para área médica e farmacêutica.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química e avaliar o potencial anestésico do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso, utilizando jundiás, *Rhamdia quelen*, como animais de experimentação.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do óleo essencial das folhas frescas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso e análise de sua composição química, bem como sua atividade anestésica em peixes da espécie *Rhamdia quelen*;
- Fracionamento do óleo essencial e avaliação da atividade anestésica das frações de maior rendimento;
- Isolamento dos constituintes presentes nas frações cuja atividade anestésica foi observada;
- Identificação e avaliação da atividade anestésica dos constituintes isolados;
- Avaliação da influência do óleo essencial sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE).

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 O gênero *Aloysia*

O gênero *Aloysia* (Verbenaceae), geralmente muito aromático, é originário do continente sul-americano, principalmente da Argentina, mas também pode ser encontrado na América do Norte. Na região sul do continente americano, 34 espécies do gênero foram catalogadas, entre estas doze podem ser encontradas no Brasil (CORDO e DELOACH, 1995).

Estudos etnofarmacológicos indicam que as espécies do gênero são empregadas para diferentes enfermidades. Propriedades sedativas, carminativas, antiespasmódicas, cardiotônicas, adicionalmente, efeitos benéficos sobre o sistema respiratório tem sido relatados (VITTO et al., 1997; VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006).

Existem diferentes estudos avaliando a variação da composição química dos óleos essenciais das diferentes espécies de *Aloysia*. A variabilidade ocorre principalmente em função da presença de diferentes quimiotipos, da procedência do material vegetal (SIMIONATTO et al., 2005), do órgão vegetal utilizado (GOMES e FERREIRA, 2005), da época e horário de coleta (ROSSATO et al., 2006). Quimiotipos já foram identificados para *A. sellowii* (1,8-cineol e sabineno) (ROSSATO et al., 2006) e *A. citriodora* (sinônimo *A. triphylla*) (neral, citronelal e β -tujona) (LIRA et al., 2008).

A comparação da composição química entre óleo essencial obtido pelo método de hidrodestilação e o extrato volátil obtido por CO₂ supercrítico foi realizada para as folhas de *A. triphylla*. Os dois métodos forneceram extratos com os mesmos constituintes majoritários, no entanto, as quantidades foram diferentes, sendo que estes estavam em maiores proporções no óleo obtido por hidrodestilação (CABRAS et al., 2003). *A. sellowii* foi submetida aos mesmos processos extrativos, sendo que concentrações semelhantes do composto majoritário foram obtidas para as duas metodologias (ROSSATO et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado os efeitos dos óleos essenciais obtidos a partir de espécies do gênero. O óleo essencial de *A. triphylla* apresentou potente atividade antibacteriana frente a microrganismos causadores de infecções genito-urinárias (ROJAS et al., 2010). Os compostos voláteis de outra espécie, *A. sellowii*, também foram ativos frente a diferentes microrganismos; adicionalmente, demonstraram alta toxicidade frente *Artemia salina*, com CL₅₀ de 2,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SIMIONATTO et al., 2005). Um *screening* avaliando a toxicidade de óleos essenciais de diferentes espécies frente *A. salina* demonstrou que os óleos

essenciais de *A. triphylla* e *A. polystachya* não são tóxicos, apresentando como CL_{50} 1279 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 6459 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (OLIVA et al., 2007). O óleo essencial de *A. virgata* também apresentou atividade antimicrobiana (MONTANARI et al., 2011).

Existem poucos estudos relacionados à atividade de espécies desse gênero sobre sistema nervoso central. As atividades ansiolítica e antidepressiva do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *A. polystachya* em camundongos e ratos foram relatadas. Frações obtidas a partir do extrato bruto não foram capazes de deslocar o radioligante ^3H -flunitrazepam do sítio específico para benzodiazepínicos (BDZ) nos receptores GABA_A (ácido gama-aminobutírico tipo A). Portanto, os efeitos ansiolíticos são provavelmente mediados por um mecanismo diferente da modulação do sítio BDZ nos receptores GABA_A (MORA et al., 2005; HELLIÓN-IBAROLLA, et al., 2006; 2008).

Dois diterpenos foram isolados do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *A. virgata*, sendo que estes apresentaram atividade sobre os receptores GABA_A , em ensaio com radioligante ^3H -flunitrazepam. No entanto, apenas um deles, (16*R*)-16,17,18-triidroxifilocladan-3-ona, apresentou efeito ansiolítico em camundongos, os quais foram totalmente revertidos através de um pré-tratamento com flumazenil (antagonista específico dos BDZ). Portanto, a atividade deste composto é mediada pela interação com sítio de ligação dos BDZ nos receptores GABA_A (WASOWSKI e MARDER, 2011).

O extrato aquoso das folhas de *A. citriodora* apresentou efeitos sedativos em camundongos, os quais foram potencializados pelo diazepam e antagonizados pelo flumazenil, sugerindo o efeito sobre o sítio BDZ nos receptores GABA_A como mecanismo de ação (RAGONE et al., 2010).

Outras atividades farmacológicas puderam ser encontradas para espécies do gênero. O extrato metanólico de *A. triphylla* apresentou efeito inibitório moderado em hiperperistalse em ratos (CALZADA et al., 2010). Estudos indicam que um componente do óleo essencial (aldeído C-9) poderia ser um dos responsáveis pela atividade antidiarréica da espécie (PEREZ et al., 1998). Em experimentos *ex vivo*, atividade espasmolítica também foi documentada para o seu extrato hexânico e aquoso (MONTER et al., 2010; RAGONE et al., 2007), bem como, para o extrato aquoso e tintura de *A. gratissima* e *A. polystachya* (CONSOLINI et al., 2011). Atividades antiinflamatória e hipotensora em ratos foram observadas com a utilização do extrato hexânico e aquoso de *A. citriodora*, respectivamente (MONTER et al., 2010; RAGONE et al., 2010).

5.1.1 *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso.

A espécie, *A. gratissima* é um arbusto que pode alcançar no máximo três metros de altura, ocorrendo na forma de touceiras densas e desordenadas, apresentando espinhos nos ramos. Suas folhas são pequenas (normalmente 1-2 x 0,5-0,8 cm), oblongas a oblanceoladas e obtusas, apresentam-se em pares opostos e são mais pálidas na parte inferior. Suas flores são de coloração branca, dispostas em cachos ao longo dos ramos, estas são muito aromáticas e florescem na primavera e verão (FRANCO et al., 2007; WOOD, 2009). Existem diferentes variedades dessa espécie, as quais podem ser classificadas de acordo com algumas diferenças morfológicas e também de distribuição (BRUSOTTI et al., 2007). É conhecida popularmente como “alfazema-do-Brasil”, “garupá”, “erva-de-Nossa-Senhora”, “erva-santa” e “erva-da-pontada”. Além disso, apresenta os seguintes sinônimos: *Aloysia lycioides* (Cham.), *Lippia lycioides* (Steud.) e *Verbena gratissima* (Gillies & Hook) (SOUZA e WIEST, 2007).



Figura 1. *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso. A: Imagem obtida no local de coleta, Morro Cechella, Santa Maria-RS em 13 de abril de 2010. B: Exsicata.

Estudos etnofarmacológicos citam para as folhas de *A. gratissima* os seguintes usos na medicina popular: nos casos de hipertensão e cefaléias, como hipocolesterolemiantes, nos casos de afecções do estômago, resfriado e gripe (VENDRUSCOLO et al., 2005). A esta espécie também são atribuídas propriedades cardiotônicas, sedativas, carminativas, diaforéticas e digestivas (VITTO et al., 1997; GOLENIOWSKI et al., 2006).

Alguns estudos sobre atividade antimicrobiana de *A. gratissima* mostram que seu extrato hidroalcoólico apresenta atividade bacteriostática frente a *Rhodococcus equi* e bactericida para *Pasteurella multocida* (isolado clínico animal), bactérias envolvidas em afecções respiratórias humanas e animais (SOUZA e WIEST, 2007). Frente a *Bacillus subtilis*, seu extrato hidroalcoólico e seu óleo foram bacteriostáticos (DUARTE, 2004; 2006). O óleo essencial também apresentou atividade equivalente ao cloranfenicol frente a *Staphylococcus aureus* (FRANCO et al., 2007). A referida espécie vegetal também apresentou atividade contra o vírus herpes simples tipo I (HSV-1) (MONTANHA et al., 2004).

A propriedade antiespasmódica do extrato aquoso e tintura de *A. gratissima* em experimentos *ex vivo* foi comprovada (CONSOLINI et al., 2011). O extrato aquoso da referida espécie vegetal, administrado oralmente em camundongos *Mus musculus* machos, apresentou atividade gastroprotetora frente ao etanol absoluto (BUCCIARELLI et al., 2007). O seu extrato aquoso também demonstrou atividade antidepressiva quando administrado por via oral em camundongos Swiss machos. O mecanismo de ação envolvido seria a inibição da ativação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e também, o envolvimento na via L-arginina-NO-GMPc (ZENI et al., 2011).

Trabalhos anteriores mostram diversos constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *A. gratissima*, os quais geralmente apresentam diferenças quantitativas, que estão associadas principalmente aos diferentes locais de coleta. Ricciardi et al. (2006) analisaram o óleo essencial de exemplares desta espécie coletados em três locais próximos à cidade de Corrientes (Argentina) no outono, primavera e verão. Os principais constituintes identificados foram β -elemeno, viridiflorol, β -cariofileno, α -tujona, 10-*epi*-cubebol, biciclogermacreno, (*E*)-nerolidol e germacreno D. A composição química dos óleos essenciais apresentou significativa variação associada às diferentes épocas de coleta, bem como à localização. A porcentagem de tujona encontrada nas amostras provenientes de uma das localidades é um fato importante, devido à toxicidade deste composto. Além disso, é importante a quantificação de seus isômeros, devido as suas diferenças quanto à toxicidade e atividade convulsivante, uma vez que, β -tujona geralmente apresenta menor toxicidade (HÖLD et al., 2000; RICCIARDI et al., 2006).

Dambolena et al. (2010) identificaram 1,8-cineol (45,5%), sabineno (8,3%), acetato de carvacrila (8,2%) e espatulenol (8,7%) como constituintes majoritários do óleo essencial da referida espécie coletada na região noroeste da Argentina. Óleo essencial rico em sabineno

(29,95%), β -pineno (9,66%) e β -bisaboleno (5,81%) foi descrito por Soler et al. (1986a) em material vegetal coletado em Minas, Uruguai.

Trans-pinocanfona (10,86%), acetato de *trans*-pinocarvila (9,27%) e *trans*-cariofileno (5,95%) foram os compostos majoritários detectados em amostra cultivada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas (CPQBA) da UNICAMP - SP (SARTORATTO e AUGUSTO, 2003). Altos teores de β -pineno (14,06%), *trans*-pinocanfona (18,42%) e acetato de *trans*-pinocarvila (13,55%) foram detectados no óleo de *A. gratissima*, coletada no Horto de Plantas Medicinais da FF/UFG (Goiânia – GO), no mês de março (FRANCO et al., 2007). Isopinocanfona (25,4%), limoneno (15,1%) e guaiol (12,7%) foram os constituintes majoritários encontrados em óleo essencial de *A. gratissima* coletada em São Carlos, SP, no mês de setembro (TROVATI et al., 2009).

O óleo essencial obtido das flores de *A. gratissima* também tem demonstrado variações quanto a sua composição. Soler et al. (1986b) identificaram β -pineno (10,72%), sabineno (18,62%), globulol (8,67%) e β -bisaboleno (7,73%) como constituintes majoritários de material vegetal coletado em Minas, Uruguai. No entanto, óleo essencial rico em pulegona (65,80%) foi obtido por Zygadlo et al. (1995) sendo que, neste caso, a espécie foi coletada em Córdoba, Argentina.

A ampla variabilidade relacionada à composição química do óleo essencial de *A. gratissima* pode interferir diretamente na sua atividade farmacológica. Como esta espécie é empregada na medicina popular para o tratamento de diferentes enfermidades, cuidados devem ser tomados, pois a eficácia pode ser afetada (DAMBOLENA et al., 2010). Sendo assim, estudos referentes à melhor época do ano, local de coleta, quimiotipo e composição do solo são necessários.

5.2 Atividade anestésica geral em peixes

Os peixes podem ser submetidos a certas condições de estresse, que podem provocar alterações no crescimento, reprodução, comportamento e sensibilidade ou pré-disposição a doenças, prejudicando o desempenho animal (WEBER, 2011). Os agentes estressores podem estar relacionados aos parâmetros da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, dureza, entre outros), ou ainda relacionados com atividades de manejo em piscicultura, tais como biometria, transporte e sexagem (GOMES et al., 1999, 2006; GOLOMBIESKI et al., 2003;

COSTA et al., 2004; URBINATI et al., 2004; BOLASINA, 2011; CUNHA et al., 2011; GOMES et al., 2011; BECKER et al., 2012).

Durante a exposição a um agente estressor, o animal desenvolve diferentes respostas, as quais podem ser classificadas como primárias, secundárias e terciárias (MAZEAUD et al., 1977; WEDEMEYER e MCLEAY, 1981; WENDELAAR-BONGA, 1997). As respostas primárias estão relacionadas à exposição aguda ao agente estressor, que resulta em liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e também corticosteróides (cortisol) para a corrente sanguínea. Estes, por sua vez, são responsáveis por alterações fisiológicas e comportamentais, tais como aumento da ventilação branquial, mudanças de coloração da pele, alteração dos batimentos cardíacos e níveis iônicos plasmáticos, definidos como respostas secundárias. As respostas terciárias estão relacionadas à exposição crônica ao estressor, resultando em diminuição do desempenho animal (ganho de peso, conversão alimentar) e também reprodutivo. Dependendo da intensidade ou duração da exposição, o animal pode seguir para um período de exaustão, onde a saúde ou até mesmo a vida pode ser comprometida (ELLIS et al., 2011; WEBER, 2011).

Quando os peixes estão frente a uma situação de estresse, ocorre a liberação imediata de catecolaminas para a corrente sanguínea, devido à estimulação nervosa das células cromafins. Adicionalmente, ocorre estimulação do eixo hipotalâmico-pituitária-interrenal (HPI), o hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (HLC), o qual atua sobre a pituitária promovendo liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atua nas células interrenais, resultando em liberação de corticosteróides para o sangue, principalmente o cortisol. A intensidade da elevação dos níveis de catecolaminas e cortisol, bem como o seu tempo de duração pode variar em função da espécie em estudo e o do tipo de estresse (agudo ou crônico) ao qual os animais estão sendo submetidos (BARTON e IWANA, 1991; REID et al., 1998; ELLIS et al., 2011).

Esta condição resulta em uma série de alterações fisiológicas, como aumento do nível de glicose e lactato plasmático, distúrbio osmorregulatório, alterações hematológicas como hematócrito, entre outras. Dessa forma, além da quantificação do cortisol, estes parâmetros têm sido monitorados, a fim de caracterizar as condições de estresse em diferentes espécies (BARCELLOS et al., 2001; BARTON et al., 2005; BOLACINA, 2011; MARICCHIOLO; GENOVESE, 2011).

A aplicação de agentes anestésicos em piscicultura é constante, a fim de reduzir ou até mesmo evitar uma condição de estresse, além de facilitar o manejo dos animais (COYLE et

al., 2004). A administração pode ser oral, injetável ou através de banho de imersão, onde o anestésico é diluído na água (NEIFFER; STAMPER, 2009).

Diferentes estágios podem ser observados até a anestesia ser atingida. Primeiramente é verificado um estado de leve sedação, seguida por sedação profunda, perda total do equilíbrio e anestesia, a qual é caracterizada por perda da atividade reflexa, sem nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes (Tabela 1) (GOMES et al. 2011).

Tabela 1: Estágios de anestesia em peixes.

| Estágio | Descrição | Características |
|---------|---------------------------|--|
| 1 | Sedação leve | Perda parcial da reação aos estímulos externos. |
| 2 | Sedação profunda | Perda parcial do equilíbrio e da reação aos estímulos externos. |
| 3a | Perda total do equilíbrio | Os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação. |
| 3b | Perda total do equilíbrio | A habilidade da natação é interrompida, mas os peixes respondem à pressão no pedúnculo caudal. |
| 4 | Anestesia | Perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos, mesmo aos fortes (pressão no pedúnculo caudal). |
| 5 | Colapso medular (morte) | O movimento respiratório cessa (morte). |

Adaptada de Gomes et al. 2011.

Durante a avaliação da atividade anestésica, alguns efeitos são minuciosamente avaliados, como os tempos de indução e recuperação. Também é importante a análise de parâmetros sanguíneos que determinam a condição de estresse do animal. Estas variáveis podem determinar a eficiência do método ou agente anestésico escolhido para promover anestesia. A eficácia dos agentes anestésicos pode ser influenciada por alguns fatores, os quais podem estar relacionados à espécie de peixe envolvida, bem como a algumas variações ambientais (COYLE et al., 2004). A razão entre a área das brânquias e o peso corpóreo, a taxa metabólica e o tamanho dos indivíduos são variáveis entre as espécies (WOODY et al., 2002; TSANTILAS et al., 2006). Temperatura, pH e salinidade da água são exemplos de variáveis ambientais (STEHLY e GINGERICH, 1999; MYLONAS et al., 2005).

Embora o emprego de anestésicos com a finalidade de reduzir as reações de estresse e facilitar o manejo dos peixes seja uma prática comum, a própria utilização de algumas substâncias pode promover uma resposta de estresse nos animais. Em estudo realizado por Zahl et al. (2010), benzocaína, metomidato, isoeugenol e metanossulfonato de tricaína (MS-222) promoveram o aumento dos níveis de cortisol em *Salmo salar*, *Gadus morhua* e *Hippoglossus hippoglossus*. Além disso, alguns efeitos adversos como secreção de muco, irritação das brânquias e danos a córnea já foram observados (INOUE et al., 2003). Dessa forma, torna-se importante a pesquisa de novas substâncias ativas, com potencial atividade anestésica, mais seguras e de baixo custo.

5.2.1 Anestésicos de origem sintética

Metanossulfonato de tricaína (MS-222) é o único composto anestésico permitido pelo FDA (Food and Drug Administration) para utilização em peixes destinados ao consumo humano (ROSS e ROSS, 2008). No entanto, outros anestésicos, tais como benzocaína, quinaldina e metomidato, são empregados na pesquisa e em peixes que não serão destinados ao consumo humano (COYLE et al., 2004).

A benzocaína e o MS-222 são classificados como anestésicos locais, cujo mecanismo de ação é explicado pelo bloqueio dos canais de sódio, reduzindo os potenciais de ação. No entanto, quando administrados em peixes através de banho de imersão, estes compostos atuam de forma sistêmica, promovendo anestesia geral, através da ação sobre o sistema nervoso central. O mecanismo de ação responsável pela anestesia geral ainda não está elucidado (CARTER et al., 2011; ZAHL et al., 2012).

MS-222 é efetivo e extremamente solúvel em água, no entanto, apresenta alto custo e acidez elevada, podendo diminuir consideravelmente o pH da água, o que pode resultar em alterações prejudiciais aos peixes. Portanto, a utilização de tampões para manter o pH no banho anestésico é necessária. Adicionalmente, diversos cuidados devem ser tomados ao manipular este produto e equipamentos de proteção individual devem ser utilizados para evitar o contato direto com o fármaco (CARTER et al., 2011).

A benzocaína merece destaque devido ao preço acessível e segurança para os manipuladores, sendo um dos anestésicos mais utilizados para peixes no Brasil (GOMES et al., 2001). Apresenta menor solubilidade em água em relação ao MS-222, assim, é necessário

ser dissolvida em etanol ou acetona antes de ser adicionada à água (NEIFFER e STAMPER, 2009).

A quinaldina é um líquido oleoso, amarelo, com limitada solubilidade na água e, dessa forma, necessita ser diluída em etanol antes de ser colocada na água. Como este composto é lipossolúvel, pode ocorrer acumulação em alguns tecidos, como cérebro (NEIFFER e STAMPER, 2009). O aumento dos níveis de cortisol e glicose quando do uso deste anestésico foi observado (DAVIS e GRIFFIN, 2004). Adicionalmente, esta substância pode ser irritante para os peixes e promover contrações musculares leves (COYLE et al., 2004).

O metomidato é um ativador dos receptores GABA_A, promovendo assim efeitos sedativos. No entanto, apresenta limitada ação anestésica geral. Este composto também é capaz de inibir a produção de cortisol. Dessa forma, pode ser eficiente em procedimentos que necessitem somente da sedação dos animais, como transporte (NEIFFER e STAMPER, 2009; ZAHL et al., 2012).

A escolha de um determinado anestésico depende de diferentes fatores e, entre estes, a ausência de efeitos adversos nos animais, bem como a segurança dos manipuladores devem ser levados em consideração. Outra questão importante é a variabilidade da resposta individual e entre as espécies, sendo difícil determinar qual o anestésico mais eficaz e seguro (ZAHL et al., 2012).

5.2.2 Anestésicos de origem natural

Mentol e eugenol são os anestésicos naturais utilizados no Brasil. O eugenol é o constituinte majoritário do óleo essencial de plantas do gênero *Eugenia*, enquanto que o mentol é proveniente do óleo essencial de espécies de *Mentha*, principalmente *M. arvensis* L. (GONÇALVES et al., 2008).

O eugenol e o óleo de cravo, obtido da espécie *Eugenia caryophyllata*, foram efetivos em relação à atividade anestésica em baixas concentrações para diferentes espécies de peixes, tendo demonstrado boa margem de segurança (KEENE et al., 1998; VIDAL, et al., 2007, 2008; HONCZARYK e INOUE, 2009). Baixas concentrações destes anestésicos demonstraram eficácia como sedativos, podendo ser aplicados em atividades como transporte (COOKE, et al., 2004; BECKER et al., 2012). A capacidade de prevenir o aumento do nível plasmático de cortisol também foi comprovada (CUNHA et al., 2010a; IVERSEN et al., 2003). Ramanayaka e Attapatu (2006) avaliaram o potencial anestésico do extrato aquoso de

diferentes plantas em carpa comum, *Cyprinus carpio*, sendo que o extrato aquoso de cravo demonstrou os melhores resultados em relação à indução e recuperação da anestesia.

O mentol demonstrou eficiência anestésica para tambaqui, *Colossoma macropomum*, na concentração de 150 mg L⁻¹, na qual os níveis sanguíneos de glicose permaneceram próximos aos normais (FAÇANHA e GOMES, 2005). A atividade anestésica do mentol também foi avaliada em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo que neste estudo não foram avaliados parâmetros de estresse (GONÇALVES et al., 2008). Entretanto, este composto causou aumento da glicose sanguínea em tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, indicando uma condição de estresse nesta espécie (SIMÕES; GOMES, 2009). Em estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando a espécie *Xenopus laevis*, o mentol demonstrou efeito modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A, agindo sobre sítio similar ao do propofol, anestésico intravenoso (WATT et al., 2008).

Cunha et al. (2010b) avaliaram o potencial anestésico do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia alba* em juvenis de jundiás, *Rhamdia quelen*. Além de apresentar atividade anestésica (100 – 500 mg L⁻¹), o óleo essencial preveniu o estresse proveniente da manipulação dos peixes, fato comprovado pela inibição do aumento dos níveis de cortisol plasmático em peixes submetidos à concentração de 300 mg L⁻¹. Este óleo essencial também foi capaz de anestésiar cavalos marinhos, *Hippocampus reidi*, nas concentrações de 50 - 450 µL L⁻¹, bem como apresentou atividade sedativa e inibiu o aumento de glicose sanguínea durante o transporte destes animais na concentração de 15 µL L⁻¹ (CUNHA et al., 2011). Em estudo realizado por Heldwein et al. (2012) foi observado um efeito sinérgico entre o óleo essencial de *L. alba* e o diazepam em jundiás. Adicionalmente, os efeitos do óleo foram antagonizados pelo flumazenil, demonstrando a potencial modulação dos receptores GABA_A como mecanismo de ação anestésica do óleo essencial desta espécie vegetal.

Parodi et al. (2012) demonstraram a atividade anestésica do óleo essencial de *L. alba* e *A. triphylla* em sub-adultos e pós-larvas de camarão, *Litopenaeus vannamei*. As concentrações efetivas de *L. alba* foram 750 e 500 µL L⁻¹ para sub-adultos e pós-larvas, respectivamente, enquanto que 300 µL L⁻¹ do óleo essencial de *A. triphylla* foi efetivo para ambos estágios.

O óleo essencial de *Malaleuca alternifolia* foi eficaz como anestésico em carpa comum, *C. carpio*, na concentração de 200 – 600 µL L⁻¹. A segurança do óleo essencial foi avaliada através da exposição dos peixes a concentração de 500 µL L⁻¹ durante diferentes tempos. Foi observada mortalidade a partir de 45 min. de exposição ao anestésico (HAJEK, 2011).

6 MANUSCRITO

Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso in silver catfish *Rhamdia quelen*

Simone Cristina Benovit¹, Lenise de Lima Silva¹, Joseânia Salbego¹, Vania Lúcia Loro², Carlos Augusto Mallmann³, Bernardo Baldisserotto^{1,4}, Érico Marlon de Moraes Flores², Berta Maria Heinzmann^{1,5, *}

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁵Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* **Corresponding author:** Berta Maria Heinzmann. Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com Phone: 55 55 3220-9674 fax: 55 55 3220-8248

ABSTRACT

This work aimed to isolate the active compounds responsible for the anesthetic activity detected for the essential oil of *Aloysia gratissima* (EOA) in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Acetylcholinesterase (AChE) activity under the influence of EOA was also investigated. Silver catfish were submitted to anesthesia bath with EOA, its fractions and isolated compounds to determine time of anesthetic induction and recovery. Eugenol (50 mg L⁻¹) was used as positive control. EOA was effective as anesthetic at concentrations of 300 to 900 mg L⁻¹. However, silver catfish presented involuntary muscle contractions during induction and recovery. AChE activity was not affected by EOA. The bio-guided fractionation of EOA furnished *E*-(-)-pinocamphone, (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaiol and (+)-spathulenol. *E*-(-)-pinocamphone caused the same side effects observed to the EOA. (-)-Caryophyllene oxide, (-)-guaiol and (+)-spathulenol showed only sedative effects at proportional concentrations to those of the constituents in EOA, but (+)-spathulenol (51.2 mg L⁻¹) promoted deep anesthesia without side effects. A higher concentration of (+)-spathulenol, and lower or absent amounts of *E*-(-)-pinocamphone could contribute to improve the activity and safety of the EOA. (+)-Spathulenol showed potent sedative and anesthetic activities in silver catfish, and could be considered as a promising compound to the development of a new anesthetic.

Keywords: anesthesia, silver catfish, *E*-(-)-pinocamphone, (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaiol, (+)-spathulenol.

1. Introduction

There are different handling practices in fish farming, such as biometrics and transport. These practices can cause stress, which can be detrimental to animal performance. Anesthetics are used in this context to maintain fish welfare, minimizing stressful situations and facilitating handling [1-2]. Natural products have been evaluated as an alternative to synthetic anesthetics, such as 2-phenoxyethanol, quinaldine sulfate and benzocaine, which may cause some side effects in fish and handlers [3-4]. Anesthetic activity of some compounds isolated from plants, such as eugenol [5-7] and menthol [8], and also of some essential oils, such as the ones obtained from *Eugenia caryophyllata* [3], *Lippia alba* [9-10], *Ocimum gratissimum* [11] and *Melaleuca alternifolia* [12] have been reported for different fish species.

The genus *Aloysia* (Verbenaceae) is originally from South America, where 34 species were cataloged, and among these 12 may be found in Brazil [13]. Certain species of *Aloysia* are known to exhibit central activity. Extracts of *A. polystachya* showed anxiolytic and antidepressant-like effects in mice [14-15] and rats [16]. Additionally, two compounds isolated from *A. virgata* showed central effects in mice [17]. The essential oil of *A. triphylla* showed potent anesthetic activity in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [18] and silver catfish (*Rhamdia quelen*) [19]. Zeni et al. [20] reported antidepressant activity of aqueous extract of *A. gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso in mice. This species is known in Brazil as *erva-santa*, which means holy herb [21], and has been used in folk medicine due to its sedative properties [22]. The essential oil of this plant has anesthetic activity in Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) [23].

This work aimed to determine the efficacy of the essential oil obtained from leaves of *A. gratissima* (EOA) as anesthetic for silver catfish. Acetylcholinesterase (AChE) activity under its influence was also investigated. In addition, we performed the bio-guided fractionation of EOA aiming to isolate the active compounds responsible for the effects noted.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material. Aerial parts of *A. gratissima* were collected in April 2010 in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Voucher specimen (SMDB 13.077) was kept in the Biology Department of the Universidade Federal de Santa Maria and identified by PhD Professor Marcos Sobral, UFSJ, and PhD Professor Solon Jonas Longhi, UFSM.

2.2 Essential oil extraction. The essential oil was obtained from fresh leaves of *A. gratissima* by hydrodistillation with a Clevenger type apparatus for 3 h [24]. Samples of the essential oil were stored at -4°C in amber glass bottles prior to the tests or isolation.

2.3 GC-MS and NMR analysis .GC-MS TIC analysis of EOA and fractions were performed using an Agilent-6890 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector, with an HP5-MS column (5% phenyl - 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i. d. x 0.25 µm) and EI-MS of 70 eV. The isolated compounds were analyzed by a Varian CP-3800 gas chromatograph coupled to a Saturno mass selective detector, using VF-5 MS column (Varian, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Conditions of analysis: injector 1177 (MS), 250°C, split 1:20; injector 1093 (FID), 250°C. The operating conditions were: split inlet 1:100; temperature program, 40-320°C at 4°C min⁻¹; carrier gas He; flow rate 1.3 mL min⁻¹; injector and detector temperature 250°C. The constituents were identified by comparing their Kovats retention index and mass spectra with a mass spectral library [25] and literature data [26].

Optical rotations were obtained on a Perkin Elmer 343 polarimeter. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded in CDCl₃ on Bruker HPX 300 FT-NMR at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C with TMS as internal standard.

2.4 Fractionation and isolation of essential oil. EOA (6.03 g) was first submitted to fractionation by column chromatography (3.5 x 52 cm) with 300 g silica gel 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) as stationary phase and hexane:acetone (99:1 v/v) as mobile phase. The fractions obtained (100 mL each) were gathered in 16 main fractions (Frs. A-P) based on the TLC profile (silica gel F254; detection: anisaldehyde H₂SO₄). The anesthetic activity of the five fractions with higher yield (B, D, F, G, and J) was evaluated, two of them (G and J) showed the best results, and were subsequently fractionated.

Fraction G (910.4 mg) was submitted to CC (1.9 x 61 cm) with 89 g of silica gel 60 and eluted with hexane:ethyl ether (99:1 v/v) to obtain fractions of 20 mL, giving 23 main fractions (G₁₋₂₃). The fraction G₉ (167.7 mg) was rechromatographed by CC (1 x 31.5 cm) using 18 g of silica gel 60 impregnated with 10% silver nitrate [27] and hexane:acetone (99:1 v/v). Fractions of 10 mL were collected and pooled together to give 10 main fractions (G_{9A-J}). Purification of the main constituent of G_{9B} (99.0 mg) was performed with CC (1 x 28.5 cm) using 15 g silica gel 60 and eluted with chloroform:hexane:ethyl acetate (78:20:2 v/v/v), to obtain *E*-(-)-pinocamphone (76.1 mg). Fractions G₁₇ - G₂₀ were gathered (112.7 mg) and

chromatographed by CC (1 x 30 cm) using 16.31 g of silica gel 60 impregnated with 10% silver nitrate and hexane:ethyl acetate (97:3 v/v) to give (-)-caryophyllene oxide (91.1 mg). Fraction J (493.3 mg) was submitted to CC (1.6 x 47.5 cm) with 48 g of silica gel 60 impregnated with 10% silver nitrate, using hexane:ethyl ether (92:8 v/v) as eluent, and furnished (-)-guaiol (107.0 mg) and (+)-spathulenol (91.3 mg).

E-(-)-pinocamphone: ^1H NMR, δ (ppm): 0.84 (s, 3H, H9); 1.05 (d, 3H, H10); 1.12 (d, 1H, H7a); 1.29 (s, 3H, H8); 1.88 (dt, 1H, H1); 2.06 (m, 1H, H5); 2.38* (m, 1H, H4a); 2.41* (m, 1H, H7b); 2.57 (m, 1H, H2); 2.58 (m, 1H, H4b) (* These values can be exchanged). ^{13}C NMR (ppm), δ : 14.96 (C10); 19.70 (C9); 26.28 (C8); 29.04 (C7); 38.24 (C5); 39.36 (C6); 44.29 (C4); 44.39 (C1); 46.41 (C2); 215.34 (C3). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24.54^\circ$ (*c* 0.22, CHCl_3).

(-)-Caryophyllene oxide: ^1H NMR, δ (ppm): 0.9 (m, 1H, H); 0.91 (s, 3H, H13); 0.93 (s, 3H, H12); 1.13 (s, 3H, H14); 1.25 (m, 1H, H6a); 1.35 (m, 1H, H2a); 1.58 (m, 3H, H2b, H10a, H10b); 1.7 (m, 1H, H1); 2.02 (m, 1H, H3b); 2.03 (m, 1H, H7b); 2.17 (m, 1H, H6b); 2.27 (m, 1H, H7a); 2.54 (q, 1H, H9); 2.80 (dd, 1H, H5); 4.89 (s, 1H, H15a); 4.97 (s, 1H, H15b). ^{13}C NMR (ppm), δ : 16.94 (C14); 21.59 (C13); 27.18 (C2); 29.78 (C7); 29.84 (C12); 30.14 (C6); 33.96 (C11); 39.12 (C3); 39.72 (C10); 48.68 (C9); 50.74 (C1); 59.74 (C4); 63.68 (C5); 112.69 (C15); 151.76 (C8). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -62.5^\circ$ (*c* 0.24, CHCl_3).

(-)-Guaiol: ^1H NMR, δ (ppm): 0.94 (d, 3H, H14); 0.98 (d, 3H, H15); 1.14 (s, 3H, H12); 1.17 (s, 3H, H13); 1.27, 1.95 (both m, 1H each, H3); 1.52 (m, 1H, H7); 1.70, 1.55 (both m, 1H each, H9); 1.80, 1.44 (both m, 1H each, H8); 2.13, 1.87 (dd, m respectively, 1H each, H6); 2.28 (m, 1H, H10); 2.41, 2.05 (both m, 1H each, H2); 2.52 (dd, 1H, H4). ^{13}C NMR, δ (ppm): 19.69 (C15); 19.88 (C14); 25.93 (C12); 27.26 (C8); 27.31 (C13); 27.80 (C6); 30.91 (C3); 33.64 (C10); 33.73 (C9); 35.34 (C2); 46.27 (C4); 49.59 (C7); 73.48 (C11); 138.69 (C5); 140.07 (C1). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.125^\circ$ (*c* 0.16, CHCl_3).

(+)-Spathulenol: ^1H NMR, δ (ppm): 0.39 (dd, 1H, H6); 0.64 (m, 1H, H7); 0.92 (m, 1H, H8b); 0.97 (s, 3H, H13); 0.98 (s, 3H, H12); 1.21 (s, 3H, H15); 1.25 (dd, 1H, H5); 1.48 (m, 1H, H3b); 1.55 (m, 1H, H2b); 1.70 (m, 1H, H3a); 1.83 (m, 1H, H2a); 1.91 (m, 1H, H8a); 1.98 (m, 1H, H9a); 2.14 (m, 1H, H1); 2.35 (dd, 1H, H9b); 4.60 (d, 2H, H14a/H14b). ^{13}C NMR, δ (ppm): 16.29 (C13); 20.21 (C11); 24.74 (C8); 26.03 (C15); 26.68 (C2); 27.46 (C7); 28.62 (C12); 29.90 (C6); 38.83 (C9); 41.71 (C3); 53.37 (C1); 54.27 (C5); 80.90 (C4); 106.22 (C14); 153.38 (C10). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +8.66^\circ$ (*c* 0.15, CHCl_3).

2.5 Animals. Silver catfish were purchased from local producers. Fish were kept in continuously aerated 250 L tanks. A semi-static system was used, where 50% of the water

volume was exchanged once a day. In experiment 1, the water parameters were maintained at the following values: temperature, 15.90 ± 0.14 °C; pH, 7.37 ± 0.11 ; dissolved oxygen, 8.65 ± 0.07 mg L⁻¹; total ammonia, 2.43 ± 0.81 mg L⁻¹. In the other experiments, the values were 19.33 ± 0.69 °C; pH, 7.19 ± 0.56 ; dissolved oxygen, 6.61 ± 0.95 ; total ammonia, 1.06 ± 0.39 mg L⁻¹. Dissolved oxygen and temperature were measured with a YSI oxygen meter. The pH was verified with a DMPH-2 pH meter. Total ammonia levels were determined by the salicylate method [28]. Fish were fed once a day until satiation with commercial feed for juveniles containing 28.0% of crude protein. The juveniles were fasted for 24 h prior to the experiments. The experimental methodologies were approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (process No. 46/2010).

2.6 Experimental procedure. Three groups of experiments were performed to evaluate the sedative and anesthetic potential, and, also, recovery of silver catfish exposed to EOA, fractions and isolated compounds. Animals were transferred to aquaria containing 1 L of water and the sample to be tested, previously diluted in ethanol 95% (1:10), to evaluate the time required to reach stages of anesthesia [7]. In this method, each juvenile is used only once to observation of deep sedation (S2), partial (S3a) and total loss (S3b) of equilibrium, anesthesia (S4) and/or medullar collapse (S5). Anesthesia was determined by loss of reflex activity and no reaction to strong external stimuli (pressure on caudal peduncle). The animals remained in the anesthetic bath until they reached S4 or for 30 min. After anesthesia induction, each fish was measured, weighed and transferred to an anesthetic-free aquarium to recover. The fish were considered to have recovered if their normal posture and behavior were restored. After that, the animals were transferred to 30 L tanks, where possible side effects or mortality was examined after 24 h of exposition. Control experiments were performed using aquaria containing ethanol at the highest concentration used to dilute the EOA.

In experiment 1, the anesthetic activity of EOA was evaluated. Ten juvenile of silver catfish (6.82 ± 2.04 g and 9.10 ± 0.91 cm) were used for each concentration of EOA (90, 300, 450, or 900 mg L⁻¹). Experiment 2 was performed to compare the activity among 450 mg L⁻¹ EOA and the fractions with higher chromatographic yield obtained by column chromatography (B, D, F, G and J). Six juveniles (8.66 ± 2.32 g and 9.52 ± 0.86 cm) were used for testing each fraction, at proportional concentrations to those of the major constituents in the EOA. In experiment 3, the sedative and anesthetic activities of the isolated compounds were evaluated. Six juveniles (6.99 ± 2.24 g and 9.44 ± 1.03 cm) were used for each concentration. The isolated compounds were evaluated at proportional concentrations to those

of the constituents in the EOA at concentrations of 450, 675 and 900 mg L⁻¹, which correspond to: 19.06, 28.60 and 38.14 mg L⁻¹ of *E*-(-)-pinocamphone; 10.00, 15.00, 20.00 mg L⁻¹ of (-)-caryophyllene oxide; 32.65, 48.96 and 65.30 mg L⁻¹ of (-)-guaaiol; and 12.80, 19.20 and 25.60 mg L⁻¹ of (+)-spathulenol. Additional concentrations of (-)-caryophyllene oxide (40 mg L⁻¹) and (+)-spathulenol (51.20 mg L⁻¹) were tested. (-)-Guaaiol and (+)-spathulenol were also evaluated in association (32.65 and 12.80 mg L⁻¹, respectively). Eugenol at concentration of 50 mg L⁻¹ was used as positive control [6].

2.7 Long time exposure. This experiment evaluated the effects of the long time exposure of silver catfish to EOA and (+)-spathulenol at sedative concentrations. Considering the sedative concentrations determined in the experiments described in the previous sections, four experimental groups were performed: EOA at 90 mg L⁻¹, (+)-spathulenol at 2.6 mg L⁻¹ (proportional concentration of the constituent in the EOA at 90 mg L⁻¹), ethanol (at the concentration used to dilute the EOA) and water.

Silver catfish (6.72 ± 2.01 g; 8.75 ± 1.02 cm) were transferred to aquaria containing 1 L of water and the sample to be tested. Six animals were used for each group to determine the time to reach stage S3a. Animal condition was evaluated in the first 30 min of exposure and after 24 h. After exposure, fish were transferred to anesthetic-free 7 L tanks, where possible signs of intoxication or mortality were examined for additional 24 h.

2.8 Acetylcholinesterase assay. Six juvenile of silver catfish (20.49 ± 6.71 g; 16.50 ± 1.33 cm) were exposed to each concentration of EOA (90, 300 or 450 mg L⁻¹), firstly diluted in ethanol 95% (1:10). Control experiments were performed using water alone or ethanol at the highest concentration used to dilute the EOA. Fish were euthanized by severing the spinal cord after they reached S4 or after 30 min of exposure for the controls and concentrations that did not promote anesthesia. Whole brain and muscle samples were removed, packed in eppendorf tubes and kept at -20°C for AChE analysis. AChE assay was performed in homogenates of brain and muscle according to the method described by Ellman et al. [29] and modified by Villescas et al. [30]. Homogenates (50-100 µL) were incubated with 0.8 mM of acetylthiocholine and 1.0 mM of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) at 25°C for 2 min. Protein content was determined according to Bradford [31]. Enzyme activity was expressed as micromoles of acetylthiocholine hydrolyzed per minute per milligram of protein.

2.9 Statistical analysis. Values are presented as mean \pm SEM. A Levene test was used with all data to verify the homogeneity of variances. The results were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test or Kruskal–Wallis and Dunn test, when appropriate. Comparison between spathulenol and eugenol was performed with t-test. The minimum significance level was set at $P < 0.05$. Regression analyses were performed to EOA and isolated compounds.

3. Results

The yield of EOA was $1.94 \pm 0.03\%$ (w/w). EOA showed 73 constituents, and 91.86% of the chemical composition was identified. The major compounds of EOA were 1,8-cineole (18.54%), sabinene (9.5%), guaiol (6.79%) and bicyclogermacrene (5.12%) (Table 1).

Regarding the anesthetic effect of EOA (experiment 1), silver catfish reached anesthesia at concentrations ranging from 300 (approximately 18 min) to 900 mg L⁻¹ (approximately 12 min). Fish exposed to 90 mg L⁻¹ reached stage 3a after 8 min and they kept on this stage for 30 min of observation. There were no significant differences in the induction times to anesthesia between the concentrations of 450 (approximately 13 min) and 900 mg L⁻¹ (approximately 12 min), but these induction times were significantly faster than 300 mg L⁻¹ (approximately 18 min). A significant relationship between the EOA concentration and the time required for anesthesia induction was noted for all stages (Table 2), except for recovery time. Time of recovery was significantly faster at 900 mg L⁻¹ (approximately 12 min) when compared to 300 and 450 mg L⁻¹. During this experiment, and 24 h after it, no mortality occurred, however, involuntary muscle contractions were observed in the fish during induction and recovery. The group exposed to ethanol showed light sedation (S2 - approximately 7.9 min), but it was significantly different from all EOA-treated groups.

AChE activity did not show any significant difference among treatments (Table 3). The fractions and isolated compounds obtained from EOA were not evaluated because essential oil did not influence AChE activity.

After the CC of EOA 16 fractions were obtained, of which fractions B, D, F, G and J showed higher yield (Table 4). In addition, fractions F and G showed similar chemical composition while the others showed different major constituents. Regarding the experiment 2, fraction D did not have any sedative effect within 30 min. Fish exposed to fractions B and F reached only S3a within 30 min (Table 5). Both fractions G and J resulted in anesthesia (S4) in 50% of fish with no significant differences between them. However, fraction G caused involuntary muscle contractions in fish, which are the same side effects observed during

anesthesia induction and recovery with EOA. Fraction J caused no side effects, but it showed increased recovery time in relation to the other fractions. Since fractions G and J showed anesthetic or side effects, we chose to isolate their major constituents, in order to identify the active compounds.

Fraction G was rechromatographed by CC to give *E*-(-)-pinocamphone and (-)-caryophyllene oxide, while purification of fraction J resulted in the isolation of two constituents, (-)-guaiol and (+)-spathulenol. The isolated compounds were identified by comparing the MS and NMR data with literature reports [32-36].

Juveniles submitted to *E*-(-)-pinocamphone showed different behavior of sedated or anesthetized fish. In the first minutes of exposure, a period of hyperactivity could be noted. Animals tended to present faster and erratic swimming with partial loss of equilibrium, and sudden jumping towards the water surface. Afterwards, there was a period of total loss of equilibrium, animals tumbled on the bottom of the aquarium and remained immobile even after pressure on caudal peduncle, but they responded to external stimuli made with a glass rod in the bottom of the aquarium. Then, fish went back to swimming erratically, and, at that moment, involuntary muscle contractions were noted. Fish writhe to the right and left sides, or remained contracted in “C or S-shape”. There was a significant relationship between the concentration of *E*-(-)-pinocamphone and the time required for hyperactivity stage ($y=283.198-15.111x+0.228x^2$; $r^2= 1$) and tipping stage ($y= -13.117+18.650x-0.406x^2$; $r^2= 1$). Three juveniles were found dead 24 h after the experiment.

The other isolated compounds reached stages S2 and S3a at proportional concentrations to EOA. Regarding S2, (-)-caryophyllene oxide was not significantly different from EOA, except at the lowest concentration tested in this experiment (450 mg L⁻¹). At this stage, (-)-caryophyllene oxide was significantly similar to (+)-spathulenol in all concentrations (Figure 1A). EOA was the most effective for loss of equilibrium (S3a), except at concentration of 675 mg L⁻¹, where it did not differ from (+)-spathulenol. (-)-Caryophyllene oxide and (-)-guaiol did not present statistic differences to reach stage S3a, except at the highest concentration, in which (-)-caryophyllene oxide was more effective (Figure 1B). In addition, both compounds showed different induction times from EOA.

(-)-Caryophyllene oxide, (-)-guaiol, and (+)-spathulenol showed a significant relationship between the concentrations and the time required to reach stages S2 and S3a (Table 6). (-)-Caryophyllene oxide and (-)-guaiol also showed significant relationships between the concentrations and recovery time. There was no significant difference in the recovery time of juveniles submitted to concentrations of 12.8 to 25.6 mg L⁻¹ of (+)-

spathulenol (data not shown). (-)-Caryophyllene oxide, (-)-guaïol and (+)-spathulenol did not promote mortality during induction and recovery and also 24 h after exposition, while four fish submitted to EOA were found dead 24 h after the experiment. Fish submitted to (-)-caryophyllene oxide (40 mg L⁻¹) and (-)-guaïol (48.96 and 65.30 mg L⁻¹) showed secretion of mucus during exposition. Additionally, (-)-caryophyllene oxide (15 - 40 mg L⁻¹) caused light spasms in the animals.

(-)-Caryophyllene oxide did not promoted anesthesia, even at the highest concentration tested (40 mg L⁻¹). Stage S2 and S3a were reached at 5.50±0.22 s and 25.50±4.29 s, respectively. Moreover, fish recovered after 1168.00±126.08 s. Fish submitted to the highest concentration of (+)-spathulenol (51.2 mg L⁻¹) reached S2 and S3a faster than with the positive control eugenol (Figure 2). It promoted deep anesthesia in approximately 22 min that was significantly different of time obtained with eugenol to reach the same stage. Fish submitted to eugenol recovered in approximately 15 min, differently of fish exposed to (+)-spathulenol, which did not recover within 30 min.

The association of (-)-guaïol and (+)-spathulenol resulted in decrease of induction time until stage S3a, when compared to the isolated compounds (Figure 1B). However, animals showed mucus secretion and greater recovery time than the isolated compounds alone (Figure 1C). When compared with EOA, the recovery time of the association did not differ statistically. The three isolated compounds did not show statistic differences in the recovery time at all concentrations. Moreover, only one fish submitted to EOA recovered within 30 min at the concentration of 675 mg L⁻¹.

Regarding the long exposure time (24 h), fish reached S3a at 241.50±20.28 s with EOA and 1752.50±70.94 s with (+)-spathulenol. After 24 h of exposure, no mortality was observed, and the animals submitted to EOA and (+)-spathulenol were not sedated. Fish submitted to (+)-spathulenol did not present signs of intoxication or mortality after 24 h in anesthetic-free aquaria. However, mortality (33.33%) was observed with EOA.

4. Discussion

Previous studies showed quantitative differences in the chemical composition of the EO obtained from leaves of *A. gratissima*. Dambolena et al. [37] identified 1,8-cineole (45.5%) and sabinene (8.3%) as major constituents. However, the proportion of these compounds was different from the corresponding data found in the present study. Similar proportion of guaïol (6.27%) was found by Franco et al. [38]. Varied amounts of bicyclogermacrene (0 - 12.8%)

were described by Ricciardi et al. [39], and this variation depended on sites and period of collection.

Anesthesia (S4) is achieved when fish lose reflex activity and do not show a reaction to strong external stimuli [7]. Silver catfish exposed to concentrations of 300-900 mg L⁻¹ EOA reached this stage within 12-18 min. The concentration of 900 mg L⁻¹ was the most effective, because it showed lower anesthetic induction time and recovery. The EOA at 270-900 mg L⁻¹ also provoked deep anesthesia in Brazilian flounder [23]. To reach the same level of anesthesia in a similar period of time (approximately 12 min) in silver catfish, 30 mg L⁻¹ of eugenol and 100 mg L⁻¹ of EO of *Lippia alba* are made necessary [6,9]. Moreover, 200 µL L⁻¹ of EO of *Melaleuca alternifolia* and 250 mg L⁻¹ of menthol lead to S4 in common carp, *Cyprinus carpio*, and in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, respectively [8,12].

Compounds present in fraction D did not contribute to the effects of EOA, because it did not have any sedative effect in the animals within 30 min. As silver catfish exposed to fractions B and F reached only S3a within 30 min at proportional concentrations to 450 mg L⁻¹ of EOA, the constituents present in these fractions were not the main elements responsible for the anesthetic activity of EOA. However, they may contribute to its sedative effect. Among the compounds present in fractions B and F, limonene, 1,8-cineol, α and β -pinene showed central activity in previous reports [40-42] and need to be tested in fish. On the other hand, fractions G and J promoted anesthesia in 50 % of fish, which indicates that the compounds present in these fractions contribute to the anesthetic effect of EOA.

E-(-)-pinocamphone did not induce sedation or anesthesia, but it promoted involuntary muscle contractions, which were also observed in fish exposed to EOA and fraction G. With this compound the fish showed two distinct stages, hyperactivity and tipping. Similar effects were verified in zebrafish, *Danio rerio*, exposed to caffeine, pentylentetrazole (PTZ) and picrotoxin, and were characterized as seizure [43]. *E*-pinocamphone and *Z*-pinocamphone are known antagonists of gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor; convulsions promoted by these compounds in mouse were alleviated by diazepam, and the signs of intoxication were similar to picrotoxin [33]. Therefore, at least *E*-(-)-pinocamphone, and probably also *Z*-pinocamphone, are the responsible for the side effects and mortality noted with EOA. As fish submitted to *E*-(-)-pinocamphone showed more intense side effects than EOA, the compounds with sedative/anesthetic activity present in EOA may have reduced their effects. This observation provides evidence that at least one of the components of EOA may be acting as GABA_A receptor agonist, as already demonstrated for the EO of *L. alba* [44].

The results obtained for *E*-(-)-pinocamphone are not inconsistent with the results of the AChE assay of EOA. Action in AChE was researched because the muscle inhibition of this enzyme leads to increased acetylcholine levels, resulting in excessive muscular stimulation [45]. However, AChE activity was not affected by EOA at the tested concentrations and, therefore, the contractures observed on the fish were not due to changes on activity of this enzyme. On the other hand, this response could be attributed, as reported early, to GABAergic system, and future studies should be conducted to clarify this issue.

The sesquiterpenoids (-)-caryophyllene oxide and (-)-guaiaol promoted only sedation at all tested concentrations. Higher concentrations of these compounds were not used because they caused mucus secretion on the animals. Additionally, (-)-caryophyllene oxide showed light spasm in fish. Secretion of mucus has been observed with some synthetic anesthetics for fish, such as 2-phenoxyethanol, quinaldine sulfate and benzocaine [3-4]; as well as 2,4-D [(2,4-dichlorophenoxy) acetic acid], an herbicide [46]. Caryophyllene oxide, isolated from the hexane extract of *Psidium guajava*, showed depressant effects on central nervous system in mice through potencialization of the pentobarbital induced-sleeping time [47]. However, the authors did not provide any information about the isomer which was tested. Studies on the central activity of (-)-guaiaol were not found.

Sedation induced by (+)-spathulenol agrees with those described for the EO obtained from *Baccharis uncinella*, which showed sedative effects in mice and contains spathulenol as one of the major constituents [48]. There were no other studies related to the central activity of (+)-spathulenol. Since this compound did not cause any side effects at sedative concentrations, one higher concentration was tested, which resulted in anesthesia. Fish submitted to (+)-spathulenol showed faster sedation and slower anesthesia and recovery than eugenol. Eugenol is largely used as anesthetic for fish and its activity has been proven in different species [5-7,49-50]. By the other hand, (+)-spathulenol showed better anesthetic activity than *S*-(+)-linalool isolated from the EO of *L. alba* in silver catfish. Fish submitted to (+)-spathulenol (51.2 mg L⁻¹) reached S4, while *S*-(+)-linalool promote anesthesia at 153 mg L⁻¹ [51]. Consequently, (+)-spathulenol is three times more potent than *S*-(+)-linalool. Additionally, with *S*-(+)-linalool, fish did not recover within 30 min, similar to (+)-spathulenol in the present study.

(+)-Spathulenol at 2.6 mg L⁻¹ showed to be a safe compound to sedate silver catfish for 24 h. Opposite pattern occurred with EOA, because mortality was noted after exposure for the same period of time. Spathulenol at 8 mg L⁻¹ for 24 h was classified by Ito et al. [52] as ichthyotoxic in medaka, *Oryzias latipes*. It is probable that this concentration of spathulenol

has led to S5 of anesthesia induction (medullar collapse) and caused mortality to this fish. Different results could be found due to variations between fish species in the response to anesthetics, as previously described [2]. Since the biological activity may differ among different isomers, Ito et al. [52] may have tested the (-)-spathulenol which, in turn, would present toxicity. However, the optical rotation of the compound was not determined in this study.

A relationship between concentration and recovery time was noted in fish exposed to (-)-caryophyllene oxide and (-)-guaïol, while the other tested compounds did not show the same relation. The lack of concentration influence in the recovery time was described in other studies with eugenol and EO of *L. alba* in silver catfish [6,9].

The fractionation of EOA resulted in decrease of anesthetic potential. The isolated compounds did not promote anesthesia at proportional concentrations to those of the constituents in the EOA. Moreover, the association of (-)-guaïol and (+)-spathulenol caused a decrease in time to reach stage S3a. These evidences indicate that the anesthetic and sedative effects are due to the synergism of the constituents present in EOA. Similar results were observed regarding the anticonvulsive activity of the EO of *Ocimum gratissimum* in mice. Moreover, the EO of this plant was more effective than the major constituents isolated or in association, eugenol, 1,8-cineole and *E*-caryophyllene, which were evaluated in the same proportion found for the EO [53].

Conversely, the hypothesis that the minor constituents present in fractions G and J, as well as the constituents of fractions B and F, are responsible for the anesthetic activity of EOA in silver catfish cannot be ruled out. Moreover, since the fractions of lower yield were not tested, their components could also contribute to the effect of EOA. Therefore, it is not always possible to assign the biological activity of plant extract to a single constituent or its major compounds [53]. Essential oils as well as other plant extracts contain several substances, which can show different mechanisms of action. These different mechanisms can be added together and result in improved activity [54]. Pharmacokinetic synergism can also be observed, where absorption, distribution, biotransformation or elimination of a compound can be influenced by other, obtaining positive results [55].

5. Conclusion

EOA showed anesthetic properties, however, it should be used carefully in silver catfish due to the observed side effects. *E*-(-)-pinocamphone and (-)-caryophyllene oxide contributed to

the side effects of EOA. Moreover, (+)-spathulenol showed anesthetic activity at higher concentration than it appears in EOA. Then, higher concentration of (+)-spathulenol, and lower or absent amounts of *E*-(-)-pinocamphone, could contribute to improve the anesthetic activity and safety of the EOA. (+)-Spathulenol interesting sedative and anesthetic activities to silver catfish; moreover, more studies are needed to evaluate its activity in other species, and to determine its mechanism of action.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; process 470964/2009-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS- PRONEX; process 10/0016-8). B. Baldisserotto received a research fellowship from CNPq and S.C. Benovit, J. Salbego and L.L. Silva graduate fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). The authors are grateful to PhD Professor Marcos Sobral (UFSJ, MG) and PhD Professor Solon Jonas Longhi (UFSM, RS) for identifying *A. gratissima*.

References

- [1] S.D. Coyle, R.M. Durborow, and J. H. Tidwell, "Anesthetics in aquaculture," *Southern Regional Aquaculture Center*, vol. 3900, 2004.
- [2] I.H. Zahl, O. Samuelsen, and A. Kiessling, "Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 38, no. 1, pp. 201-218, 2012.
- [3] L.A.K.A. Inoue, C.S. Neto, and G. Moraes, "Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869)," *Ciência Rural*, vol. 33, no. 5, pp. 943-947, 2003.
- [4] J. Velisek, T. Wlasow, P. Gomulka, Z. Svobodova, and L. Novotny, "Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.)," *Veterinarian Medicine (Praha)*, vol. 52, no.3, pp. 103-110, 2007.
- [5] A. G. Becker, T.V. Parodi, C.G. Heldwein, C.C. Zeppenfeld, B.M. Heinzmann, and B. Baldisserotto, "Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*," *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 38, no. 3, pp. 789-796, 2012.
- [6] M.A. Cunha, C.C. Zeppenfeld, L.O. Garcia, V.L. Loro, M.B. Fonseca, T. Emanuelli, A.P.L. Veeck, C.E. Copatti, and B. Baldisserotto, "Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet," *Ciência Rural*, vol. 40, no. 10, pp. 2107-2114, 2010.
- [7] D.P. Gomes, B.W. Chaves, A.G. Becker, and B. Baldisserotto, "Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*," *Aquaculture Research*, vol. 4, no. 6, pp. 878-886, 2011.
- [8] L.N. Simões, and L.C. Gomes, "Menthol efficiency as anesthetic for juveniles Nile tilapia *Oreochromis niloticus*," *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol. 61, n.3, pp. 613-620, 2009.
- [9] M.A. Cunha, F.M.C. Barros, L.O. Garcia, A.P.L. Veeck, B.M. Heinzmann, V.L. Loro, T. Emanuelli, and B. Baldisserotto, "Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*," *Aquaculture*, vol. 306, no. 1-4, pp. 403-406, 2010.
- [10] M.A. Cunha, B.F. Silva, F.A.C. Delunardo, S.C. Benovit, L.C. Gomes, B.M. Heinzmann, and B. Baldisserotto, "Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*," *Neotropical Ichthyology*, vol. 9, no. 3, pp. 683-688, 2011.
- [11] L.L. Silva, T.V. Parodi, P. Reckziegel, V.O. Garcia, M.E. Bürger, B. Baldisserotto, C.A. Malmann, A.M.S. Pereira, and B.M. Heinzmann, "Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.:

anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*,” *Aquaculture*, vol. 350-353, pp. 91-97, 2012.

[12] G.J. Hajek, “The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L.,” *Aquaculture Research*, vol. 42, no. 2, pp. 296-300, 2011.

[13] H.A. Cordo, and C.J. Deloach, “Natural enemies of the rangeland weed whitebrush (*Aloysia gratissima*: Verbenaceae) in South America: potential for biological control in the United States,” *Biological Control*, vol. 5, pp. 218-230, 1995.

[14] M.C. Hellión-Ibarrola, D.A. Ibarrola, Y. Montalbetti, M.L. Kennedy, O. Heinichen, M. Campuzano, J. Tortoriello, S. Fernández, C. Wasowski, M. Marder, T.C. De Lima, and S. Mora, “The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 105, no. 3, pp. 400-408, 2006.

[15] M.C. Hellión-Ibarrola, D.A. Ibarrola, Y. Montalbetti, M.L. Kennedy, O. Heinichen, M. Campuzano, E.A. Ferro, N. Alvarenga, J. Tortoriello, T.C. De Lima, and S. Mora, “The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice,” *Phytomedicine*, vol. 15, pp. 478-483, 2008.

[16] S. Mora, G. Díaz-Véliz, R. Millán, H. Lungenstrass, S. Quirós, T. Coto-Morales, and M.C. Hellión-Ibarrola, “Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats,” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, vol. 82, no. 2, pp. 373-378, 2005.

[17] C. Wasowski, and M. Marder, “Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*,” *Phytomedicine*, vol. 18, no. 5, pp. 393-401, 2011.

[18] T.V. Parodi, M.A. Cunha, C.G. Heldwein, D.M. Souza, A.C. Martins, L.O. Garcia, W. Wasielesky Jr, J.M. Monserrat, D. Schmidt, B.O. Caron, B.M. Heinzmann, and B. Baldisserotto, “The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae),” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 155, no. 3, pp. 462-468, 2012.

[19] L.T. Gressler, A.P.K. Riffel, T.V. Parodi, E.M.H. Saccol, G. Koakoski, S.T. Costa, M.A. Pavanato, B.M. Heinzmann, B.O. Caron, D. Schmidt, S.F. Llesuy, L.J.G. Barcellos, and B. Baldisserotto, “Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L’Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status,” *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12043, 2012.

[20] A.L. Zeni, A.D. Zomkowski, T. Dal-Cim, M. Maraschin, A.L. Rodrigues, and C.I. Tasca, “Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of

involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 1, pp. 864-874, 2011.

[21] A.A. Souza, and J.M. Wiest, “Antibacterial activity of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, herb-saint), used in the traditional medicine in Rio Grande do Sul State – Brazil,” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 9, no. 3, pp. 23-29, 2007.

[22] M.E. Goleniowski, G.A. Bongiovanni, L. Palacio, C.O. Nuñez, and J.J. Cantero, “Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 107, no. 3, pp. 324-341, 2006.

[23] S.C. Benovit, L.T. Gressler, L.L. Silva, L.O. Garcia, M.H. Okamoto, J.S. Pedron, L.A. Sampaio, R.V. Rodrigues, B.M. Heinzmann, and B. Baldisserotto, “Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*,” *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 43, no. 6, pp. 896-900, 2012.

[24] British Pharmacopoeia, Her Majesty’s Stationery Office, London, 2007.

[25] NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs, J. Wiley and Sons, Hoboken, 2005.

[26] R.P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Illinois, 2001.

[27] C.M. Williams, and L.N. Mander, “Chromatography with silver nitrate,” *Tetrahedron*, vol. 57, no. 3, pp. 425-447, 2001.

[28] H. Verdouw, C.J.A. Van Echteld, and E.M.J. Dekkers, “Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate,” *Water Research*, vol. 12, no. 6, pp. 399-402, 1978.

[29] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., and R.M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88-95, 1961.

[30] R. Villescas, R. Oswald, and H. Marimoto, “Effects of neonatal under nutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats,” *Journal of Nutrition*, vol. 111, no. 6, pp. 1103-1110, 1981.

[31] M.M.A. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.

- [32] J.M. Coxon, G.J. Hydes, and P.J. Steel, "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of pinane monoterpenoids," *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, vol. 2, no. 8, pp. 1351-1355, 1984.
- [33] K.M. Höld, N.S. Sirisoma, S.E. Sparks, and J.E. Casida, "Metabolism and mode of action of *cis*- and *trans*-3-pinanones (the active ingredients of hyssop oil)," *Xenobiotica*, vol. 32, no. 4, pp. 251-265, 2002.
- [34] M.C.O. Chaves, and B.V.O. Santos, "Constituents from *Piper marginatum* fruits," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 6, pp. 547-549, 2002.
- [35] P. Raharivelomana, J.-P. Bianchini, A. Cambon, M. Azzaro, and R. Faure, "Two-dimensional NMR of sesquiterpenes. 8-complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of seven sesquiterpene alcohols from *Neocallitropsis pancheri*," *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 33, no. 3, pp. 233-235, 1995.
- [36] A.A. Bolzan, "Constituents of *Senecio platensis* Arech.: isolation, structural elucidation and evaluation of the antibacterial activity," MSc. Thesis (Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil, 2007.
- [37] J.S. Dambolena, M.P. Zunino, E.I. Lucini, J.A. Zygadlo, E. Banchio, F. Biurrun, A. Rotman, and O. Ahumada, "Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 22, no. 4, pp. 289-293, 2010.
- [38] A.L.P. Franco, T.B. Oliveira, P.H. Ferri, M.T.F. Bara, and J.R. Paula, "Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L.," *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol. 4, no. 2, pp. 208-220, 2007.
- [39] G.A.L. Ricciardi, C.M. van Baren, P.D.L. Lira, A.I.A. Ricciardi, D. Lorenzo, E. Dellacassa, and A.L. Bandoni, "Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina," *and Fragrance Journal*, vol. 21, no. 4, pp. 698-703, 2006.
- [40] T.G. Vale, E.C. Furtado, J.G. Santos Jr, and G.S. Viana, "Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown," *Phytomedicine*, vol. 9, no. 8, pp. 709-714, 2002.
- [41] F.A. Santos, and V.S.N. RAO, "Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils," *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 4, pp. 240-244, 2000.

- [42] J.P. Kasanen, A.L. Pasanen, P. Pasanen, J. Liesivuori, V.M. Kosma, and Y. Alarie, "Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers," *Archives of Toxicology*, vol. 72, no. 8, pp. 514-523, 1998.
- [43] K. Wong, A. Stewart, T. Gilder, N. Wu, K. Frank, S. Gaikwad, C. Suci, J. Dileo, E. Utterback, K. Chang, L. Grossman, J. Cachat, and A.V. Kalueff, "Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish," *Brain Research*, vol. 1348, pp. 209-215, 2010.
- [44] C.G. Heldwein, L.L. Silva, P. Reckzieguel, F.M.C. Barros, M.E. Burguer, B. Baldisserotto, C.A. Malmann, D. Schmidt, B.O. Caron, and B.M. Heinzmann, "Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 45, no. 5, pp. 436-443, 2012.
- [45] M.F. Kirby, S. Morris, M. Hurst, S.J. Kirby, P. Neall, T. Tylor, and A. Fagg, "The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 40, no. 9, pp. 780-791, 2000.
- [46] R. Sarikaya, and M. Yilmaz, "Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae)," *Chemosphere*, vol. 52, no. 1, pp. 195-201, 2003.
- [47] M. Meckes, and F. Calzada, "Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system," *Phytotherapy Research*, vol. 10, no. 7, pp. 600-603, 1996.
- [48] J. Ascari, S.L. Sens, D.S. Nunes, A. Wisniewski Jr, M.D. Arbo, V.M. Linck, P. Lunardi, M.B. Leal, and E. Elisabetsky, "Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 50, no. 1, pp. 113-119, 2012.
- [49] A. Honczaryk, and L.A.K.A. Inoue, "Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills," *Ciência Rural*, vol. 39, no. 2, pp. 577-579, 2009.
- [50] L.V.O. Vidal, W.M. Furuya, T.S. Graciano, C.R. Schamber, L.D. Santos, and C.M. Soares, "Eugenol concentrations for deep anesthesia and acute toxicity in piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) juveniles," *Acta Scientiarum Biological Sciences*, vol. 29, no. 4, pp. 357-362, 2007.
- [51] B.M. Heinzmann, B. Baldisserotto, E.M.M. Flores, D. Schmidt, B.O. Caron, V.Q. Souza, C.G. Heldwein, T.V. Parodi, and E.Z. Gai, C. Roman, "Processo de obtenção de composto anestésico de *Lippia alba*, composto anestésico obtido e uso de composto como anestésico.

2011.. Processo de obtenção de composto anestésico de *Lippia alba*, composto anestésico obtido e uso de composto como anestésico,” Brazilian Patent PI1103966-3, 2011.

[52] H. Ito, H. Iwamori, N. Kasajima, M. Kaneda, and T. Yoshida, “Kunzeanones A, B, and C: novel alkylated phloroglucinol metabolites from *Kunzea ambigua*,” *Tetrahedron*, vol. 60, no. 44, pp. 9971-9976, 2004.

[53] L.A. Galindo, A.M. Pultrini, and M. Costa, “Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil,” *Journal of Natural Medicines*, vol. 64, no. 4, pp. 436-441, 2010.

[54] R. Harris, “Synergism in the essential oil world,” *The International Journal of Aromatherapy*, vol. 12, no. 4, pp. 179-186, 2002.

[55] M. Spinella, “The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines,” *Alternative Medicine Review*, vol. 7, no. 2, pp. 130-137, 2002.

TABLE 1: Chemical composition of essential oil of *Aloysia gratissima*.

| Peak | RT (min) | Constituents | (%) | RI calc | RI ref [25-26] |
|-----------|---------------|---------------------------------|--------------|---------------|-------------------|
| 1 | 9.524 | α -thujene | 0.27 | 925.3 | 924 |
| 2 | 9.756 | α -pinene | 2.74 | 931.0 | 932 |
| 3 | 10.295 | camphene | 0.19 | 944.2 | 945 |
| 4 | 11.459 | sabinene | 9.50 | 973.0 | 972 |
| 5 | 11.518 | β -pinene | 3.69 | 974.1 | 973 |
| 6 | 11.772 | 1-octen-3-ol | 0.15 | 980.3 | 979 |
| 7 | 12.205 | β -myrcene | 1.27 | 990.9 | 990 |
| 8 | 12.625 | α -phellandrene | 0.13 | 1001.2 | 1000 |
| 9 | 13.495 | <i>p</i> -cymene | 0.33 | 1022.6 | 1025 |
| 10 | 13.679 | limonene | 2.34 | 1027.1 | 1029 |
| 11 | 13.820 | 1,8-cineole | 18.54 | 1030.5 | 1031 |
| 12 | 14.538 | β -Eocymene | 0.48 | 1048.2 | 1050 |
| 13 | 15.232 | <i>Z</i> -sabinene hydrate | 1.13 | 1065.2 | 1070 |
| 14 | 16.477 | <i>E</i> -sabinene hydrate | 0.60 | 1095.8 | 1098 |
| 15 | 16.636 | linalool | 0.42 | 1099.8 | 1100 |
| 16 | 16.775 | α -thujone | 0.18 | 1103.3 | 1102 |
| 17 | 17.404 | <i>Ep</i> -mentha-2,8-dien-1-ol | 0.12 | 1119.4 | 1123 |
| 18 | 17.594 | α -campholenal | 0.13 | 1124.3 | 1126 |
| 19 | 18.056 | <i>E</i> -pinocarveol | 0.89 | 1136.1 | 1139 |
| 20 | 18.345 | <i>E</i> -verbenol | 0.50 | 1143.5 | 1145 |
| 21 | 18.951 | <i>E</i> -pinocamphone | 3.99 | 1159.0 | 1163 |
| 22 | 19.013 | pinocarvone | 0.36 | 1160.6 | 1162 |
| 23 | 19.144 | isoborneol | 0.22 | 1163.9 | 1169 |
| 24 | 19.229 | δ -terpineol | 0.18 | 1166.1 | 1166 |
| 25 | 19.455 | <i>Z</i> -pinocamphone | 1.33 | 1171.9 | 1175 |
| 26 | 19.600 | terpinen-4-ol | 0.40 | 1175.6 | 1177 |
| 27 | 19.941 | cryptone | 0.23 | 1184.3 | 1186 |
| 28 | 20.136 | α -terpineol | 0.63 | 1189.3 | 1189 |
| 29 | 20.328 | myrtenol | 0.63 | 1194.2 | 1196 |
| 30 | 21.224 | <i>E</i> -carveol | 0.18 | 1218.2 | 1217 |

| | | | | | |
|-----------|---------------|-----------------------------|-------------|---------------|-------------|
| 31 | 22.136 | carvone | 0.13 | 1243.0 | 1243 |
| 32 | 23.684 | isobornyl acetate | 0.18 | 1285.1 | 1286 |
| 33 | 23.959 | <i>E</i> -sabinyl acetate | 0.26 | 1292.6 | 1291 |
| 34 | 24.215 | <i>E</i> -pinocavyl acetate | 2.84 | 1299.6 | 1298 |
| 35 | 25.520 | δ -elemene | 0.85 | 1337.2 | 1338 |
| 36 | 26.828 | α -ylangene | 0.16 | 1375.0 | 1375 |
| 37 | 27.142 | β -bourbonene | 0.31 | 1384.1 | 1388 |
| 38 | 27.409 | β -elemene | 0.63 | 1391.8 | 1391 |
| 39 | 27.856 | methyl eugenol | 0.12 | 1405.0 | 1404 |
| 40 | 28.323 | β -caryophyllene | 2.82 | 1419.2 | 1419 |
| 41 | 28.634 | β -copaene | 0.16 | 1428.6 | 1432 |
| 42 | 28.806 | γ -elemene | 0.60 | 1433.8 | 1437 |
| 43 | 29.440 | α -caryophyllene | 0.87 | 1453.1 | 1455 |
| 44 | 29.657 | alloaromadendrene | 0.39 | 1459.7 | 1460 |
| 45 | 30.372 | germacrene D | 3.91 | 1481.4 | 1482 |
| 46 | 30.883 | bicyclogermacrene | 5.12 | 1496.9 | 1497 |
| 47 | 31.111 | germacrene A | 0.44 | 1504.1 | 1509 |
| 48 | 31.456 | cubebol | 0.68 | 1515.4 | 1515 |
| 49 | 31.655 | - | 0.37 | 1521.9 | - |
| 50 | 31.992 | - | 0.12 | 1533.0 | - |
| 51 | 32.170 | - | 0.15 | 1538.8 | - |
| 52 | 32.529 | elemol | 0.73 | 1550.6 | 1550 |
| 53 | 32.772 | germacrene B | 4.15 | 1558.6 | 1560 |
| 54 | 32.947 | <i>E</i> -nerolidol | 0.34 | 1564.3 | 1564 |
| 55 | 33.426 | spathulenol | 2.71 | 1580.0 | 1582 |
| 56 | 33.586 | caryophyllene oxide | 2.16 | 1585.3 | 1585 |
| 57 | 34.063 | guaiol | 6.79 | 1601.0 | 1601 |
| 58 | 34.338 | - | 1.44 | 1610.4 | - |
| 59 | 34.691 | - | 0.37 | 1622.4 | - |
| 60 | 34.945 | - | 0.92 | 1631.1 | - |
| 61 | 35.208 | alloaromadendrene epoxide | 0.38 | 1640.1 | 1641 |
| 62 | 35.332 | - | 0.40 | 1644.3 | - |
| 63 | 35.452 | - | 0.40 | 1648.4 | - |

| | | | | | |
|-------|--------|----------|-------|--------|------|
| 64 | 35.659 | - | 0.81 | 1655.5 | - |
| 65 | 36.095 | bulnesol | 2.38 | 1670.4 | 1672 |
| 66 | 36.285 | - | 0.18 | 1676.9 | - |
| 67 | 36.445 | - | 0.10 | 1682.3 | - |
| 68 | 36.601 | - | 0.20 | 1687.7 | - |
| 69 | 37.221 | - | 1.17 | 1709.3 | - |
| 70 | 37.579 | - | 0.66 | 1722.2 | - |
| 71 | 38.600 | - | 0.33 | 1758.9 | - |
| 72 | 38.859 | - | 0.30 | 1768.2 | - |
| 73 | 40.507 | - | 0.25 | 1828.7 | - |
| Total | | | 91.86 | | |

(%): Relative percentage; Rt: Retention time; RI cal: calculated Kovats retention index; RI ref: reference Kovats retention index. – Unidentified constituents.

TABLE 2: Time (s) required for anesthesia induction and recovery using different concentrations of EOA in *Rhamdia quelen*.

| Concentration (mg L ⁻¹) | Time of induction to anesthesia (s) | | | | Time of recovery (s) |
|--|---|---|---|--|----------------------------|
| | Stage 2 | Stage 3a | Stage 3b | Stage 4 | |
| 90 | 89.17±25.92 ^a | 519.20±30.91 ^a | - | - | 956.60±78.46 ^{ab} |
| 300 | 39.90±7.12 ^a | 163.10±12.35 ^b | 875.10±29.95 ^a | 1085.70±45.54 ^a | 1083.14±91.35 ^a |
| 450 | 16.60±1.18 ^b | 74.40±4.32 ^c | 669.10±38.58 ^b | 776.10±33.68 ^b | 1188.12±57.19 ^a |
| 900 | 15.70±1.86 ^b | 36.30±1.94 ^d | 593.00±54.50 ^b | 720.90±36.11 ^b | 746.60±54.81 ^b |
| Equations | $y=12.56+128.64^{(c)}$ $x^{(175.71)}$ $r^2=0.984$ | $\ln y=8.37-$ $0.104\ln(x)^2$ $r^2=0.988$ | $y=0.002x^2-$ $2.88x+1558.05$ $r^2=1$ | $y=0.003x^2-$ $4.49x+2141.7$ $r^2=1$ | - |

Values are means ± SEM. Different letters in the columns indicate significant differences among concentrations by one-way ANOVA and Tukey tests (S3b, S4 and recovery) or by Kruskal-Wallis and Dunn tests (S2 and S3a) (P<0.05). (–) indicates that the stage was not reached within 30 min or that there is no significant relationship.

TABLE 3: Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) of *Rhamdia quelen* exposed to EOA.

| Tissue | Treatments | | | | |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Water control | Ethanol control | EOA (mg L^{-1}) | | |
| | | | 90 | 300 | 450 |
| Brain | 0.693 \pm 0.098 ^a | 0.702 \pm 0.082 ^a | 0.672 \pm 0.093 ^a | 0.612 \pm 0.064 ^a | 0.645 \pm 0.028 ^a |
| Muscle | 0.853 \pm 0.130 ^a | 0.723 \pm 0.047 ^a | 0.743 \pm 0.064 ^a | 0.943 \pm 0.128 ^a | 1.080 \pm 0.151 ^a |

Values are means \pm SEM. Data was submitted to one-way ANOVA ($P < 0.05$).

TABLE 4: Major constituents of the fractions of higher yield obtained from EOA.

| Constituents | Fractions (%) | | | | |
|-----------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | B | D | F | G | J |
| α -pinene | 7.91 | - | - | - | - |
| sabinene | 44.26 | - | - | - | - |
| β -pinene | 15.76 | - | - | - | - |
| Limonene | 9.90 | - | - | - | - |
| 1,8-cineole | - | - | 31.19 | 9.51 | - |
| <i>E</i> -pinocamphone | - | - | 14.40 | 30.21 | - |
| <i>Z</i> -pinocamphone | - | - | - | 8.96 | - |
| <i>E</i> -pinocavyl acetate | - | - | 34.37 | 12.05 | - |
| β -caryophyllene | 9.30 | - | - | - | - |
| α -caryophyllene | - | 5.82 | - | - | - |
| germacrene D | - | 7.16 | - | - | - |
| bicyclogermacrene | - | 49.38 | - | - | - |
| germacrene B | - | 21.14 | - | - | - |
| spathulenol | - | - | - | - | 30.53 |
| caryophyllene oxide | - | - | - | 18.96 | - |
| guaiol | - | - | - | - | 30.87 |
| bulnesol | - | - | - | - | 9.12 |

(%): Relative percentage of each constituent.

TABLE 5: Time (s) required for induction and recovery from anesthesia using EOA (at concentration of 450 mg L⁻¹) and its fractions of higher yield (at proportional concentrations to those of the major constituents in the EOA) in *Rhamdia quelen*.

| Fraction | Time of induction to anesthesia (s) | | | | Time of recovery (s) |
|----------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Stage 2 | Stage 3a | Stage 3b | Stage 4 | |
| EOA | 6.67±0.99 ^b | 37.33±2.86 ^b | 930.60±290.64 ^a | 1035.33±226.44 ^a | 894.00±67.79 ^{ab} |
| B | 83.33±19.11 ^a | 762.50±52.50 ^a | - | - | 213.00±16.18 ^c |
| D | - | - | - | - | - |
| F | 99.33±32.87 ^a | 608.00±91.38 ^a | - | - | 272.50±15.73 ^c |
| G | 23.83±2.09 ^{ab} | 67.33±10.60 ^b | 279.00±96.77 ^a | 894.67±150.36 ^a | 587.50±95.97 ^b |
| J | 37.00±15.01 ^{ab} | 92.67±32.46 ^b | 1138.33±210.90 ^a | 1457.00±94.12 ^a | 1119.00±220.40 ^a |

Values are means ± SEM. Different letters in the columns indicate significant difference among treatments by one-way ANOVA and Tukey tests (stages 3a, 3b, 4 and recovery) or Kruskal-Wallis and Dunn tests (stage 2) (P<0.05). (-) indicates that the stage was not reached within 30 min.

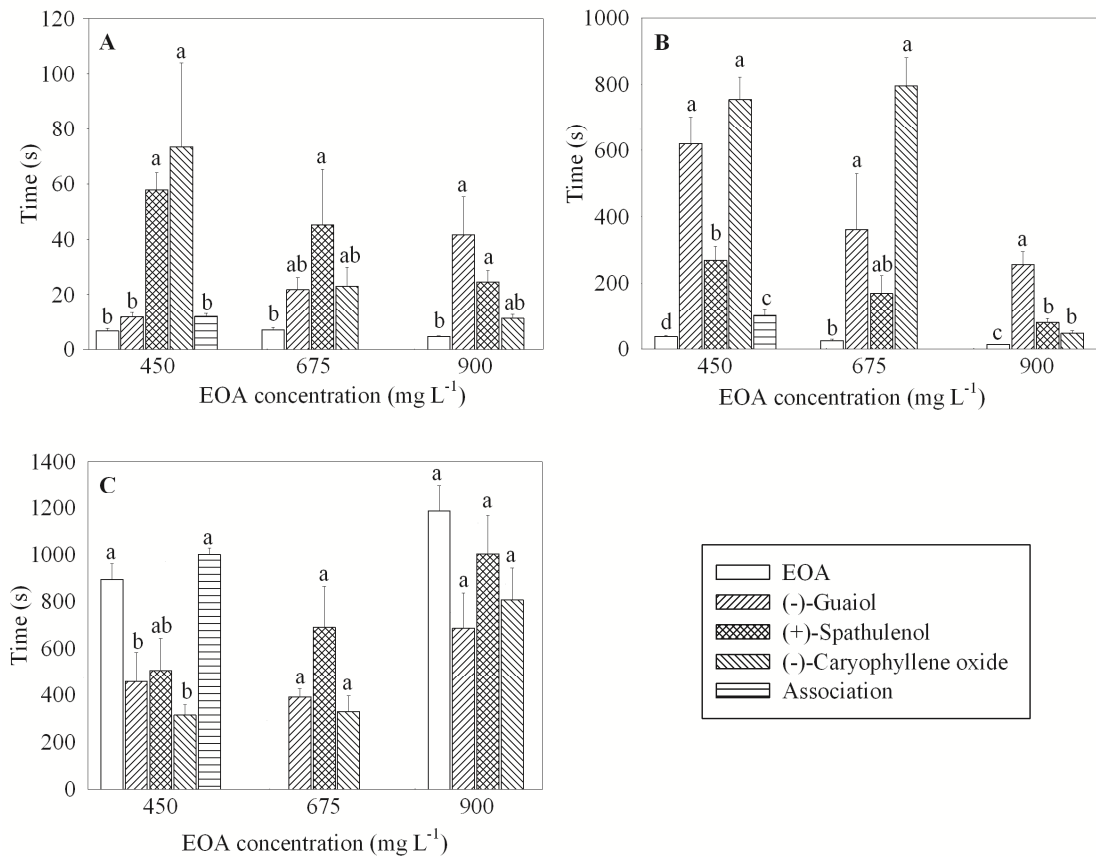


FIGURE 1. Time required for the induction and recovery from sedation in silver catfish submitted to EOA and the isolated compounds at proportional concentrations to those of the constituents in EOA: A: Stage 2; B: Stage 3a; C: Recovery. For 450 mg L⁻¹ EOA: (-)-guaiol (32.65 mg L⁻¹), (+)-spathulenol (12.8 mg L⁻¹), (-)-caryophyllene oxide (10 mg L⁻¹) and association of (-)-guaiol and (+)-spathulenol (32.65 and 12.8 mg L⁻¹); For 675 mg L⁻¹ EOA: (-)-guaiol (48.96 mg L⁻¹), (+)-spathulenol (19.2 mg L⁻¹) and (-)-caryophyllene oxide (15 mg L⁻¹); For 900 mg L⁻¹ EOA, (-)-guaiol (65.3 mg L⁻¹), (+)-spathulenol (25.6 mg L⁻¹) and (-)-caryophyllene oxide (20 mg L⁻¹). Fish submitted to 675 mg L⁻¹EOA did not recover within 30 min, so it was not shown in this figure. Stages are according to Gomes et al. (7). Maximum observation time was 30 min. N= 6 for each concentration tested. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate a significant difference between the different products at the same stage. Stage S3a and recovery time of 675 mg L⁻¹ EOA and S2 of 900 mg L⁻¹ EOA were submitted to Kruskal-Wallis and Dunn tests ($P < 0.05$). The other stages were submitted to ANOVA and Tukey tests ($P < 0.05$).

TABLE 6: Regression equations related to the time required for the induction and recovery from anesthesia using (-)-caryophyllene oxide, (-)-guaaiol and (+)-spathulenol in silver catfish juveniles. Stages are according to Gomes et al. (7). Where y = time to reach the stage (s) and x = concentration of the compound (mg L^{-1}). $N = 6$ for each concentration tested.

| Isolated compound | Induction | | Recovery |
|-------------------------|---|--|--|
| | Stage 2 | Stage 3a | |
| (-)-Caryophyllene oxide | $\ln y = 0.769 + 35.066/x$ $r^2 = 0.995$ | $y = -3873.656 + 874.635x - 48.433x^2 + 0.725x^3$ $r^2 = 1$ | $y = 2901.2 - 495.21x + 27.753x^2 - 0.411x^3$ $r^2 = 1$ |
| (-)-Guaaiol | $\ln y = 1.18 + 0.039x$ $r^2 = 0.999$ | $\ln y = 3.42 + 17.2/x^{0.5}$ $r^2 = 0.999$ | $y = 1676.76 - 59.58x + 0.68x^2$ $r^2 = 1$ |
| (+)-Spathulenol | $y = 28.28 + 6.333x - 0.377x^2 + 0.005x^3$ $r^2 = 1$ | $y = 453.198 - 11.955x - 0.285x^2 + 0.007x^3$ $r^2 = 1$ | - |

- indicates that there is no significant relationship.

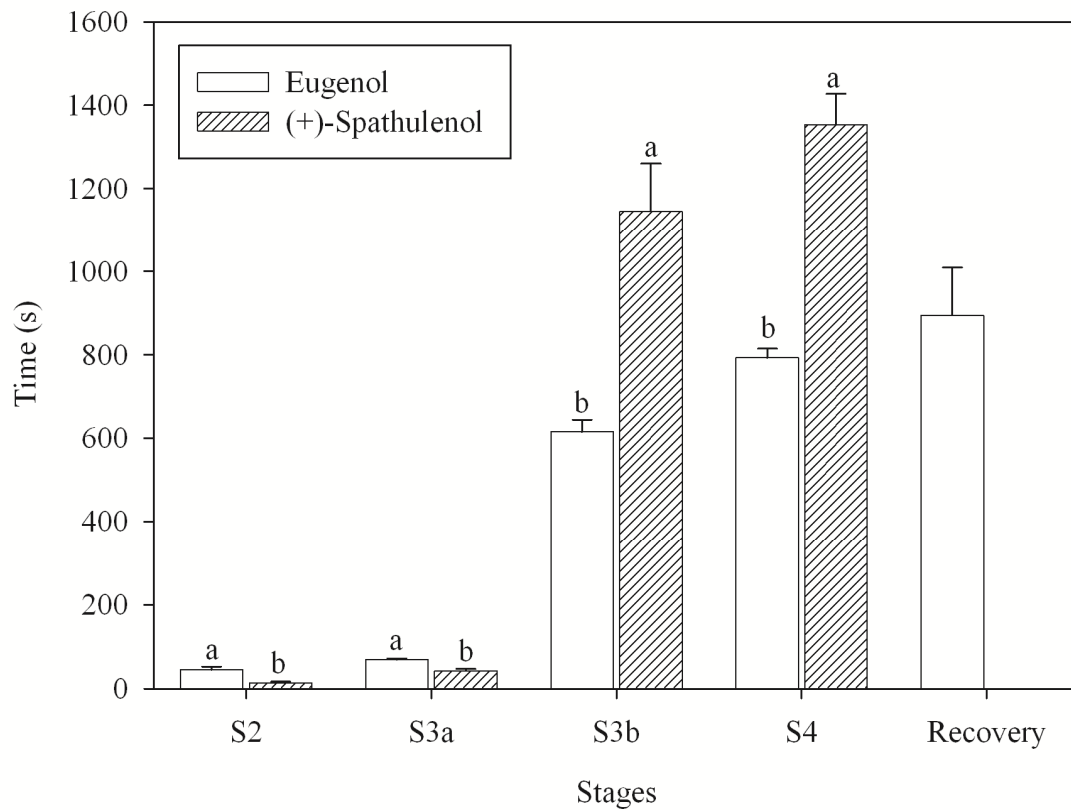


FIGURE 2. Time required for the induction of sedation and anesthesia in silver catfish submitted to (+) spathulenol (51.20 mg L^{-1}) in comparison with eugenol (50 mg L^{-1}). Stages are according to Gomes et al. (7). Maximum observation time was 30 min. $N=6$ for each concentration tested. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate a significant difference between the different products at the same stage using t-test ($P < 0.05$).

7 CONCLUSÕES

Após estudo do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Troncoso pode ser concluído que:

- O óleo essencial demonstrou atividade sedativa na concentração de 90 mg L⁻¹ e atividade anestésica nas concentrações de 300 a 900 mg L⁻¹ em peixes da espécie *Rhamdia quelen*.
- O óleo essencial promoveu alguns efeitos adversos, na forma de contrações musculares involuntárias, durante indução e recuperação da anestesia;
- O óleo essencial não apresentou efeitos sobre a enzima acetilcolinesterase;
- A *E*-(-)-pinocanfona e o (-)-óxido de cariofileno foram os constituintes responsáveis pelos efeitos adversos observados com o óleo essencial. Adicionalmente, o (+)-espatulenol apresentou atividade anestésica em concentração maior que a presente no óleo essencial, enquanto o (-)-guaiol apresentou apenas ação sedativa nas concentrações testadas. Dessa forma, concentrações maiores de (+)-espatulenol, bem como, baixas concentrações ou ausência de *E*-(-)-pinocanfona e (-)-óxido de cariofileno poderiam contribuir para melhorar a atividade anestésica do óleo essencial;
- O óleo essencial, com a composição química descrita neste trabalho, deve ser utilizado com cuidado como sedativo e anestésico em jundiás devido aos efeitos adversos observados;
- O (+)-espatulenol, devido à eficácia e segurança demonstradas, pode ser considerado um composto anestésico promissor.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2001.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407-426, 2010.

ASCARI, J. et al. Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 1, p. 113–119, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARCELLOS, L. J.G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 121-123, 2001.

BARTON, B. A.; IWANA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 10, p. 3-26, 1991.

BARTON, B. A. et al. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 172-179, 2005.

BECKER, A. G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*, **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 789-796, 2012.

BENOVIT, S.C. Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*, **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 6, p. 896-900, 2012.

BOLASINA, S. N. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. **Aquaculture**, v. 313, p. 140-143, 2011.

BOLZAN, A. A. **Constituintes de *Senecio platensis* Arech.: isolamento, elucidação estrutural e avaliação da atividade antibacteriana.** 2007. 150f. MSc. Thesis (Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil, 2007.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2007.

BRUSOTTI, J. M.; GURNI, A. A.; BASSOLS, G. B. Estudio morfo-anatomico de las variedades de *Aloysia gratissima* (VERBENACEAE). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 5, 2007.

BUCCIARELLI, A.; MANCINI, M. M.; SKLIAR, M. Propiedades gastroprotectoras de plantas medicinales. Estudios fitoquímicos y farmacológicos. **Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca**. v. 17, n. 1, 2007.

CABRAS, N. et al. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by supercritical CO₂. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 272-277, 2003.

CALZADA, F.; ARISTA, R.; PÉREZ, H. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal–gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 49-51, 2010.

CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 51-59, 2011.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73, p. 547–549, 2002.

CONSOLINI, A. E. et al. Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 889-900, 2011.

COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 239, p. 509–529, 2004.

CORDO, H. A.; DELOACH, C. J. Natural enemies of the rangeland weed whitebrush (*Aloysia gratissima*: Verbenaceae) in South America: potential for biological control in the United States. **Biological Control**, v. 5, p. 218-230, 1995.

COSTA, O. T. F. et al. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627–636, 2004.

COXON, J. M.; HYDES, G. J.; STEEL, P. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of pinane monoterpenoids. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 2, n. 8, p. 1351-1355, 1984.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. Anesthetics in aquaculture. **Southern Regional Aquaculture Center (SRAC)**. Publication 3900, 2004.

CUNHA, M. A. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2107-2114, 2010a.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403- 406, 2010b.

CUNHA, M. A. et al. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 683-688, 2011.

DAMBOLENA, J. S. et al. Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven Verbenaceae: *Lantana* and *Aloysia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 289-293, 2010.

DAR, M. Y. et al. Chemical composition, *in vitro* cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1606-1611, 2011.

DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. **Aquaculture**, v. 233, p. 531-548, 2004.

DOBETSBERGER, C.; BUCHBAUER, G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, p. 300-316, 2011.

DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 6-8, 2004.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, 2006.

ELLIS, T. et al. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, DOI: 10.1007/s10695-011-9568-y, 2011.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

FRANCO, A. L. P. et al. Evaluation of the chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc., *Ocimum gratissimum* L. and *Curcuma longa* L. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n.2, p. 208-220, 2007.

GALINDO, L. A; PULTRINI, A. M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p. 436-441, 2010.

GOLENIOWSKI, M. E. et al. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341, 2006.

GOLOMBIESKI, J. I. et al. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities and temperatures. **Aquaculture**, v. 216, p. 95-102, 2003.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 878-886, 2011.

GOMES, L. C. et al. Effect of the salt in the water for transport on survival and on Na⁺ and K⁺ levels of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, p. 1-9, 1999.

GOMES, L. C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.

GOMES, L. C. et al. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006.

GOMES, P. C. S; FERREIRA, M. F. 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, p. 73-78, 2005.

GONÇALVES, A. F. N. et al. 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. et al. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, doi:10.1111/are.12043, 2012.

HAJEK, G. J. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 296-300, 2011.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 4, p. 179-186, 2002.

HEINZMANN, B.M. et al. Processo de obtenção de composto anestésico de *Lippia alba*, composto anestésico obtido e uso de composto como anestésico. 2011.. Processo de obtenção de composto anestésico de *Lippia alba*, composto anestésico obtido e uso de composto como anestésico. **Brazilian Patent**, PI1103966-3, 2011.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 436-443, 2012.

HELLIÓN-IBAROLA, M. C. et al. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 400-408, 2006.

HELLIÓN-IBAROLA, M. C. et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p. 478-483, 2008.

HÖLD, K. M. et al. α -Thujone (the active component of absinthe): γ -aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 3826-3831, 2000.

HÖLD, K. M. et al. Metabolism and mode of action of *cis*- and *trans*-3-pinanones (the active ingredients of hyssop oil). **Xenobiotica**, v. 32, n. 4, p. 251-265, 2002.

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009.

INOUE, L. A. K. A.; NETO, C. S.; MORAES, G. Clove oil as anesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549-566, 2003.

KASANEN, J. P. et al. Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. **Archives of Toxicology**, v. 72, p. 514-523, 1998.

KEENE, J. L. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

KIRBY, M. F. et al. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

LIAPI, C. et al. Antinociceptive properties of 1,8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta Medica**, v. 73, n. 12, p. 1247-1254, 2007.

LIRA, P. L. et al. Characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 350-353, 2008.

MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **The Open Marine Biology Journal**, v. 5, p. 24-33, 2011.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

MECKES, M.; CALZADA, F. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 600-603, 1996.

MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.

MONTANHA, J. A. et al. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica. Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.

MONTER, H. P. et al. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 6, p. 309-319, 2010.

MORA, S. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 373-378, 2005.

MYLONAS, C. C. et al. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **Institute for Laboratory Animal Research Journal (ILAR)**, v. 50, n. 4, p. 343-360, 2009.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs, J. Wiley and Sons, Hoboken, 2005.

OLIVA, M. M. et al. Cytotoxic activity of Argentinean essential oils on *Artemia salina*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 4, p. 259-262, 2007.

PARODI, T. V. 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). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, n. 3, p. 462-468, 2012.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50-52, 2005.

PÉREZ, S. et al. Antidiarrhoeal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p.45-46, 1998.

RAGONE, M. I. et al. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 258-266, 2007.

RAGONE, M. I. et al. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora* Palau, on mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 79-86, 2010.

RAHARIVELOMANANA, P. et al. Two-dimensional NMR of sesquiterpenes. 8-complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of seven sesquiterpene alcohols from *Neocallitropsis pancheri*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 233-235, 1995.

RAMANAYAKA, J. C.; ATTAPATU, N. S. B. M. Fish anaesthetic properties of some local plant material. **Tropical Agricultural Research & Extension**, v. 9, 2006.

REID, S. G.; BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 120, p. 1-27, 1998.

RICCIARDI, G. A. L. et al. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 698-703, 2006.

ROJAS, L. B. et al. Chemical composition and antibacterial effects of the essential oil of *Aloysia triphylla* against genitourinary pathogens. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 1, p. 56-62, 2010.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**, 3rd edition, Blackwell Publishing Science, Oxford, 222 p. 2008.

ROSSATO, M. et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 200-202, 2006.

SANTOS, F. A., RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). **Chemosphere**, v. 52, p. 195-201, 2003.

SARTORATTO, A.; AUGUSTO, F. Application of headspace solid phase microextraction and gas chromatography to the screening of volatile compounds from some Brazilian aromatic plants. **Chromatographia**, v. 57, n. 5/6, p. 351-356, 2003.

SAVELEV, S. U.; OKELLO, E. J.; PERRY, E. K. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* Species and their constituents. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 315-324, 2004.

SILVA et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silvercatfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.350-353, p. 91-97, 2012.

SIMIONATTO, E. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aloysia sellowii*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1458-1462, 2005.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Menthol efficiency as anesthetic for juveniles Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1343-1345, 1986a.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* flower essential oil. **Planta Médica**, v. 6, p. 488-490, 1986b.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Antibacterial activity of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, herb-saint), used in the traditional medicine in Rio Grande do Sul State – Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 2, p. 130-137, 2002.

STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 365-372, 1999.

TROVATI, G. et al. Essential oil composition of *Aloysia gratissima* from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 21, p. 325-326, 2009.

TSANTILAS, H. et al. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. **Aquaculture**, v. 253, p. 64–70, 2006.

URBINATI, E. C. et al. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389–400, 2004.

VALE DO, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.

VEIGA, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Ethnobotanical survey of the medicinal plants used by the community of Ponta Grossa neighborhood, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VENDRUSCOLO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisas Botânica**, v. 56, p. 285-322, 2005.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol concentrations for deep anesthesia and acute toxicity in piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) juveniles. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 357-362, 2007.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol as an anesthetic for Nile tilapia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

VITTO, L. A. D.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: plantas nativas. **Multequina**, v. 6, p. 49-66, 1997.

WASOWSKI, C.; MARDER, M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 393-401, 2011.

WATT, E. E. et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA_A receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 120-126, 2008.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, p. 21-32, 2011.

WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (ed.). **Stress and fish**. London: Academic, p. 247-275, 1981.

WENDELAAR-BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v. 77, p. 591-625, 1997.

WOOD, J. R. I. *Aloysia axillaris* (Verbenaceae), a new species, with notes on the genus in Bolivia. **Kew Bulletin**, v. 64, p. 513-523, 2009.

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

ZAHL, I. H. et al. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 36, p. 719-730, 2010.

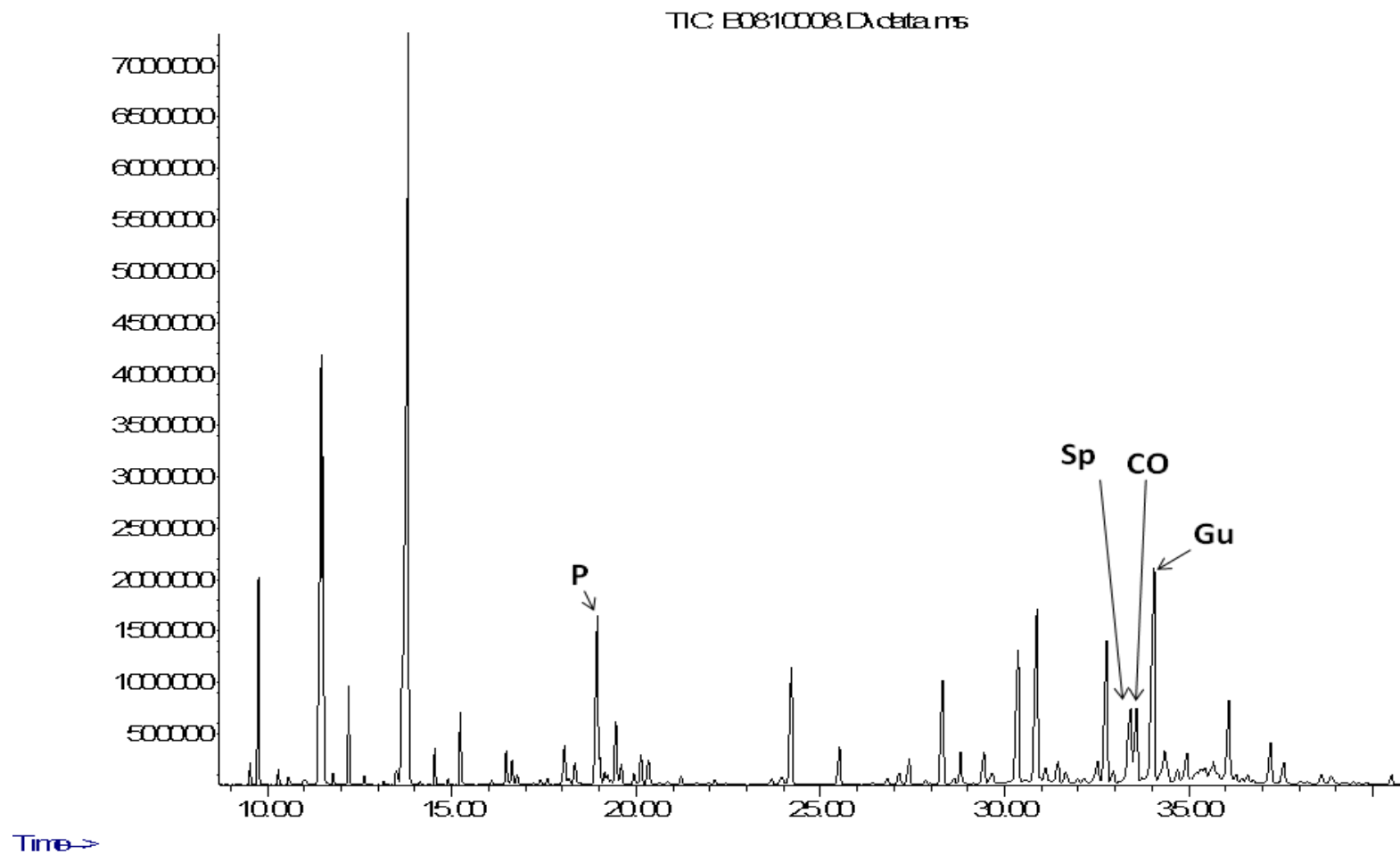
ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 201-218, 2012.

ZENI, A. L. B. et al. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 864-874, 2011.

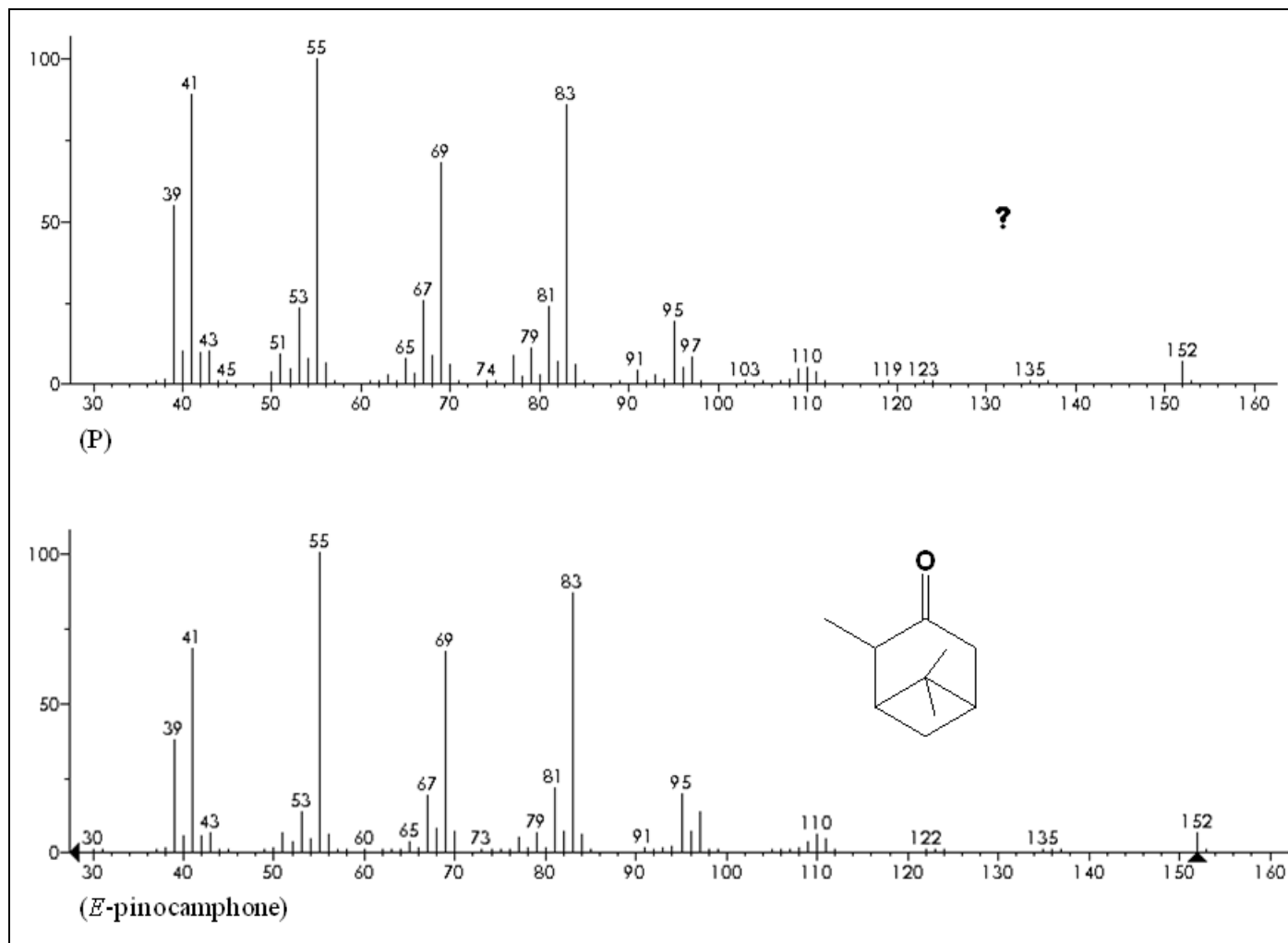
ZYGADLO, J. A. et al. Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 593-595, 1995.

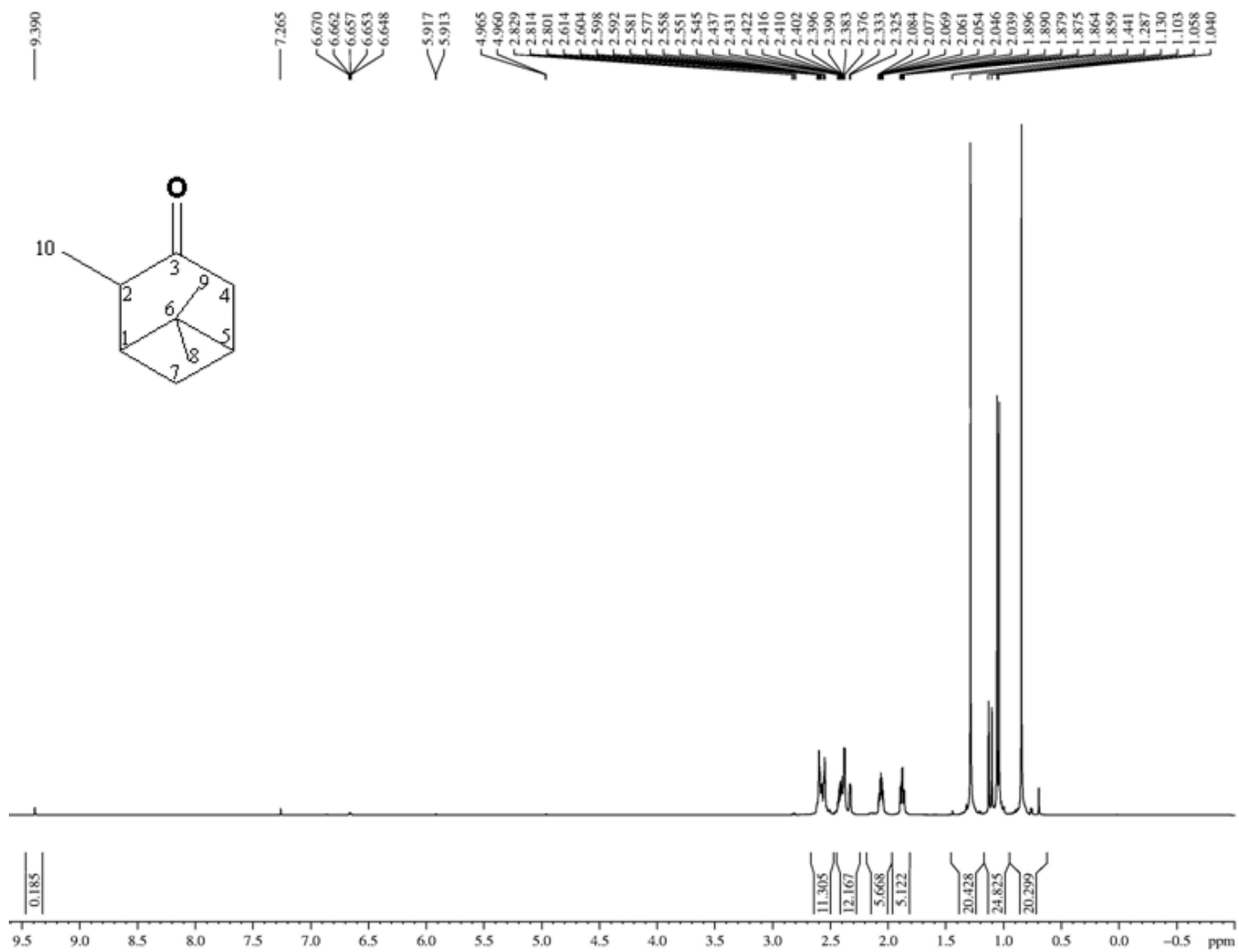
ANEXO 1: Cromatograma do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso.

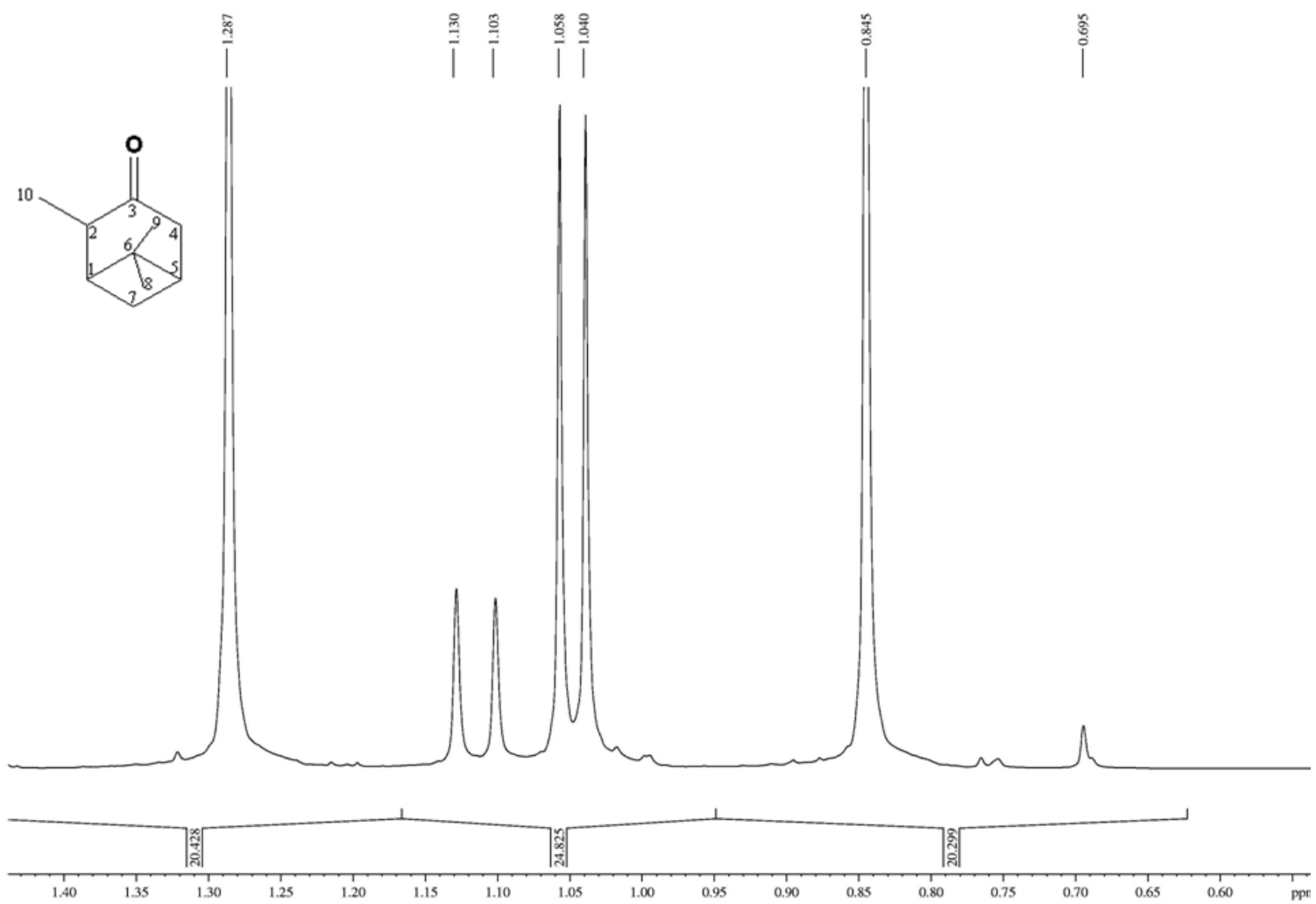
Abundance

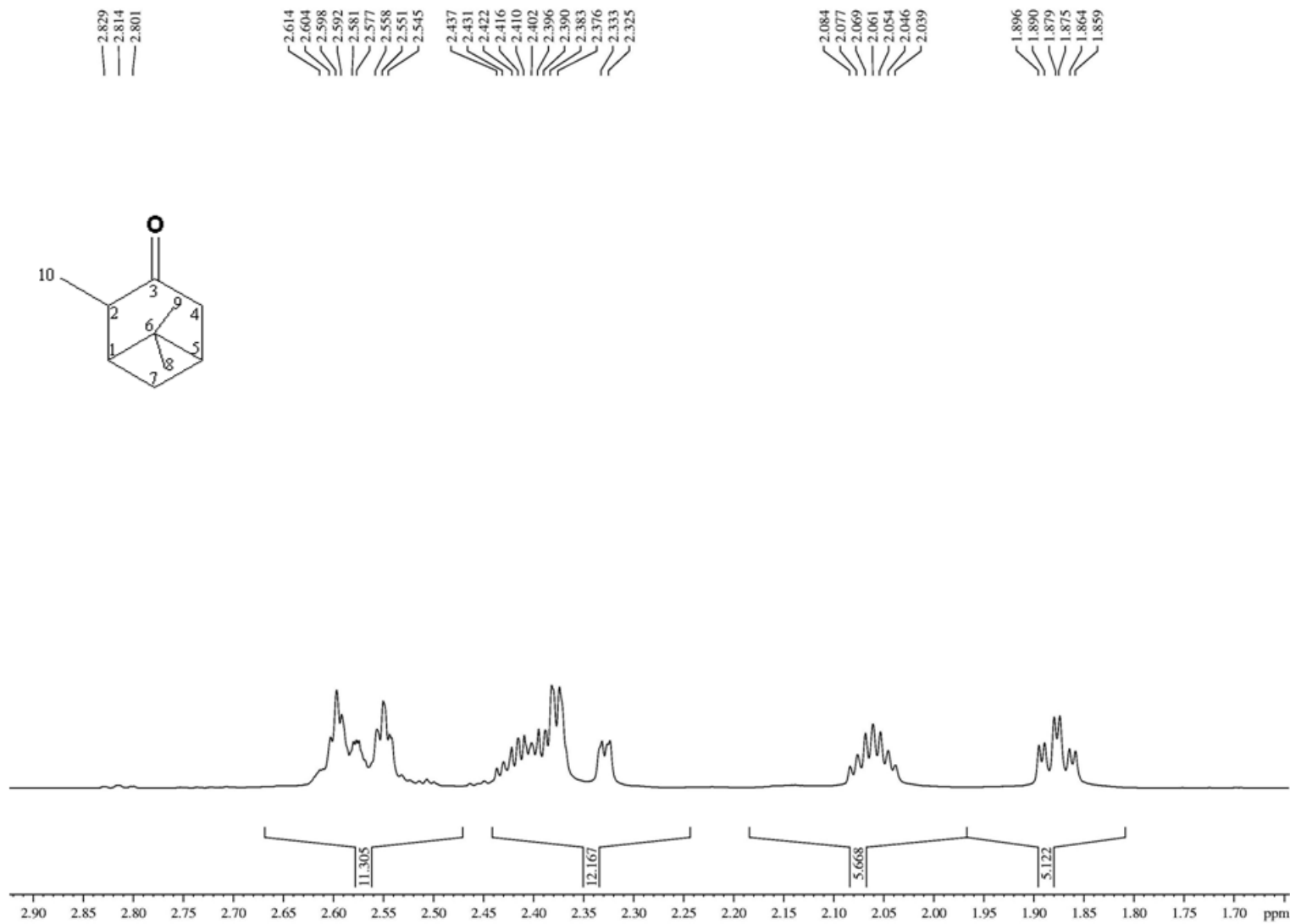


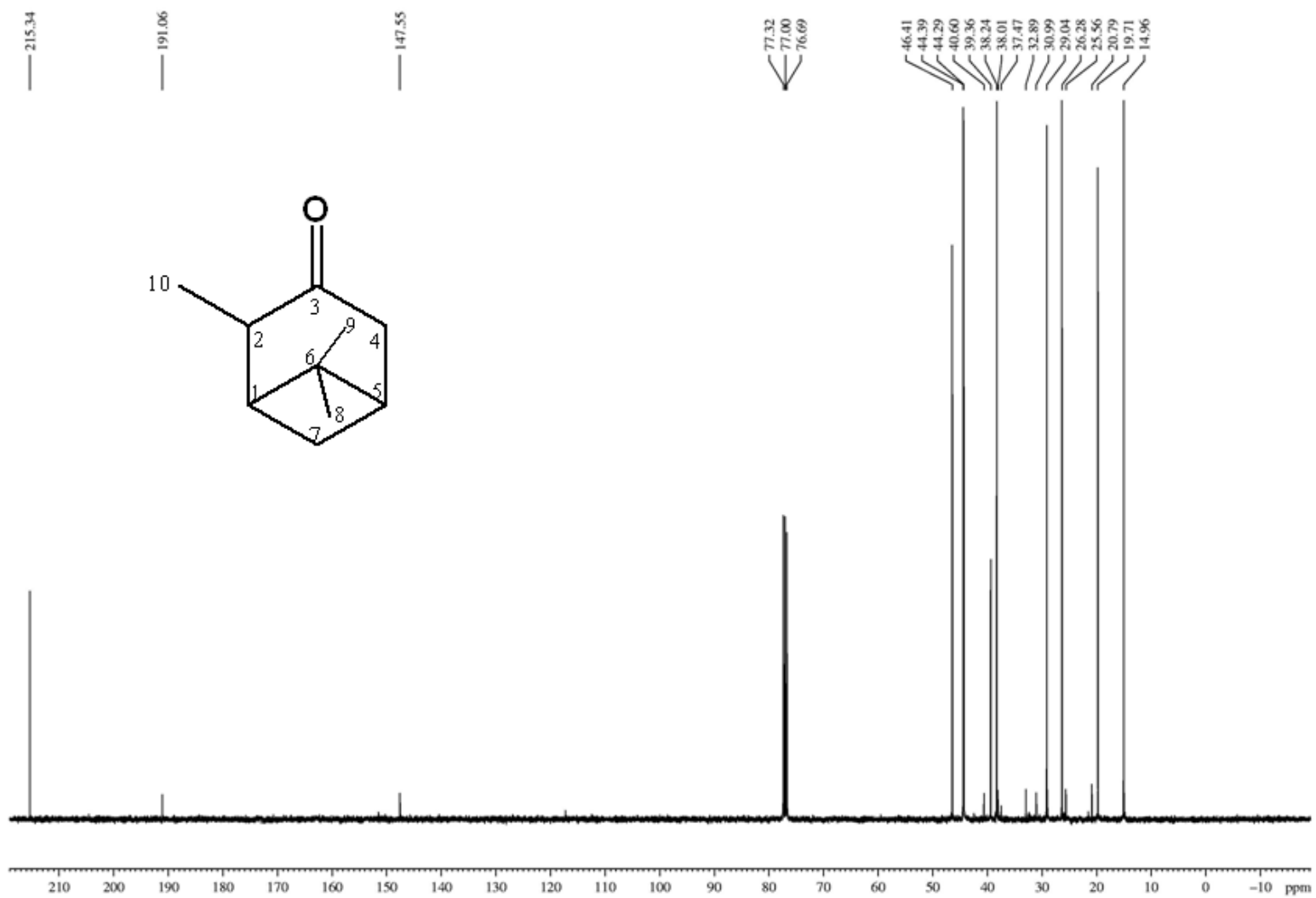
P: *E*-(-)-pinocanfona; **Sp:** (+)-espatulenol; **CO:** (-)-óxido de cariofileno; **Gu:** (-)-guaiol.

ANEXO 2: Espectro de massas da *E*-(-)-pinocanfona (NIST, 2002).

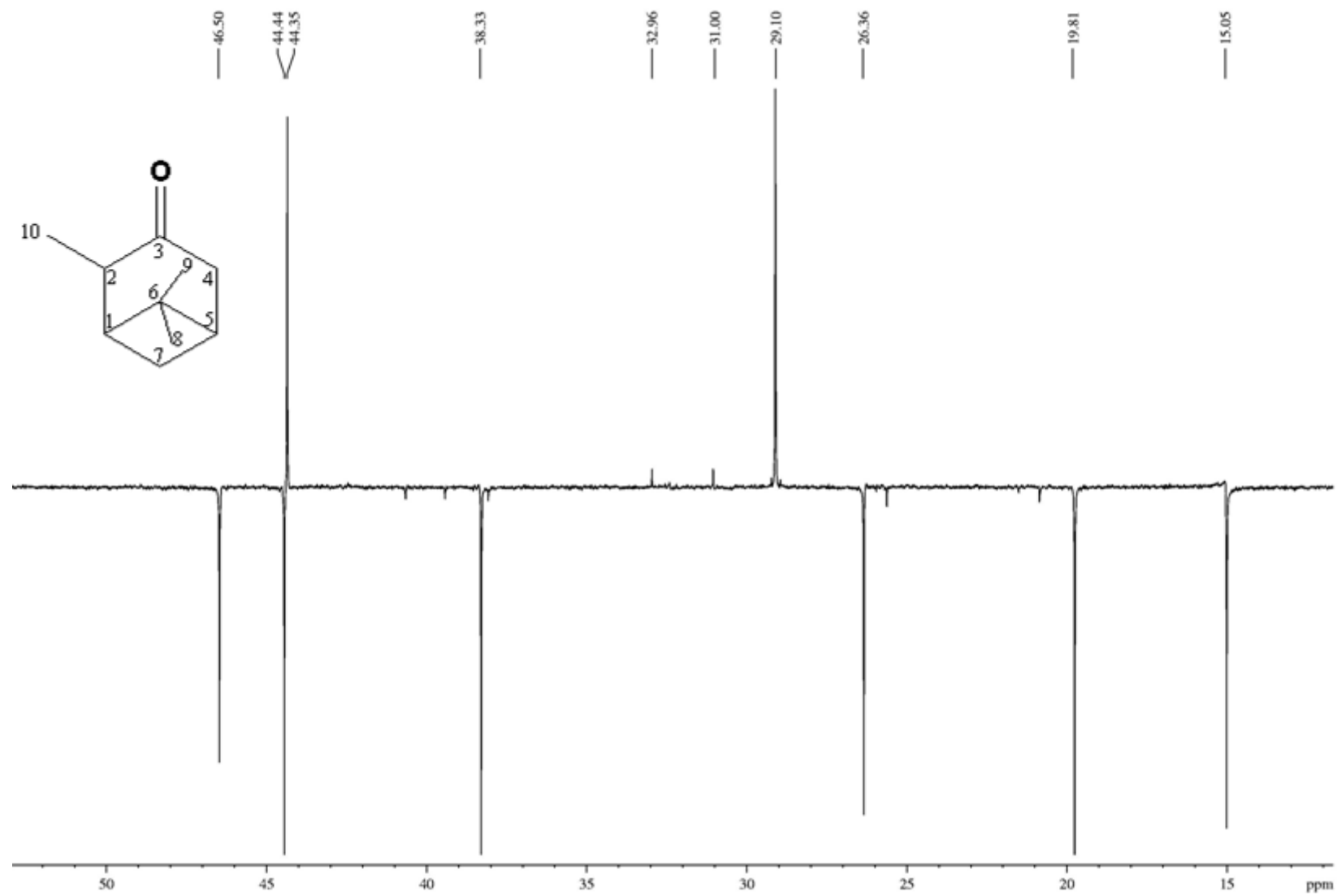
ANEXO 3: Espectro de RMN ^1H da *E*-(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl_3).

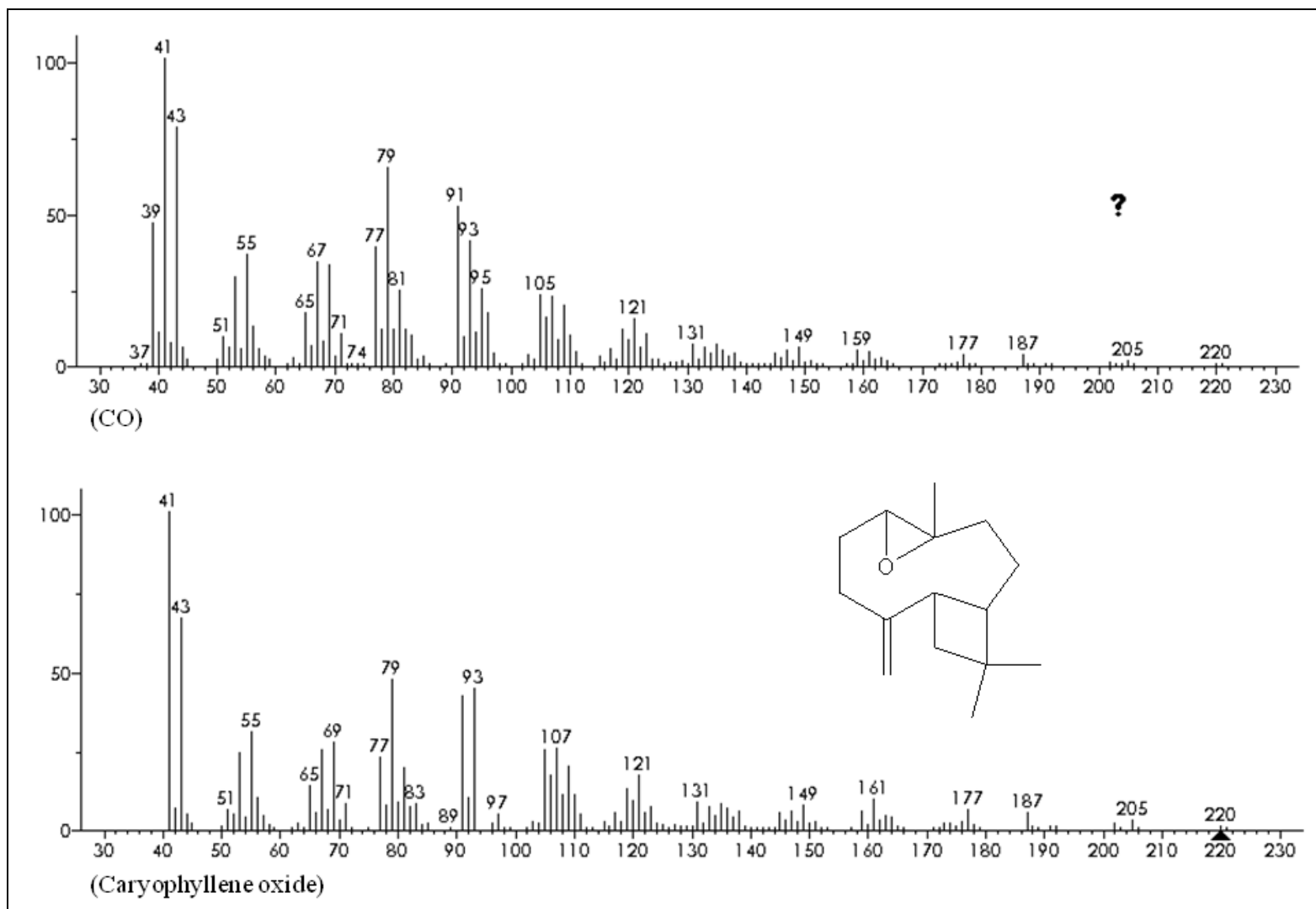
ANEXO 4: Ampliação do espectro de RMN ^1H da *E*-(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl_3).

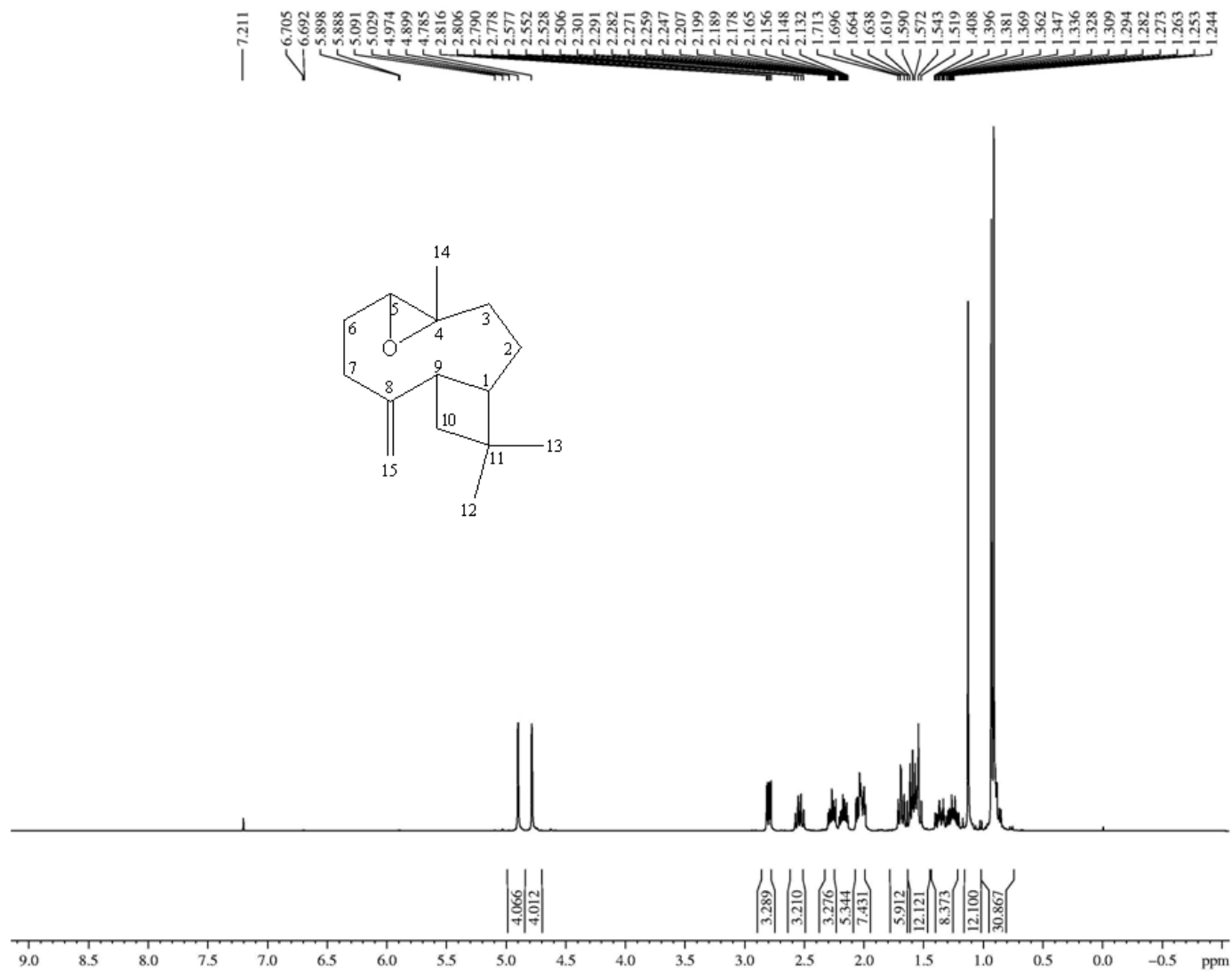
ANEXO 5: Ampliação do espectro de RMN ^1H da *E*-(-)-pinocanfona (400 MHz, CDCl_3).

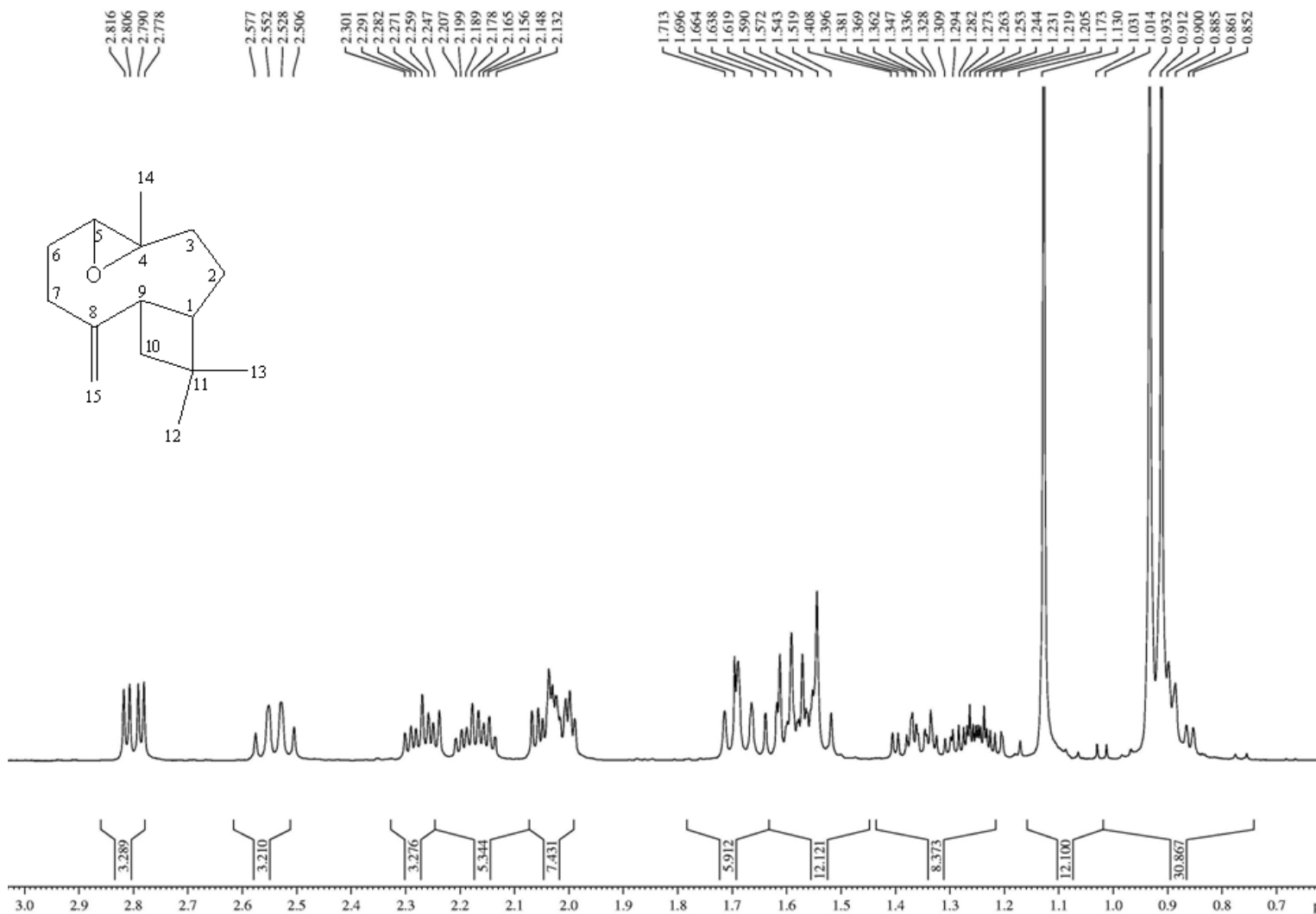
ANEXO 6: Espectro de RMN ^{13}C da *E*-(-)-pinocanfona (100 MHz, CDCl_3).

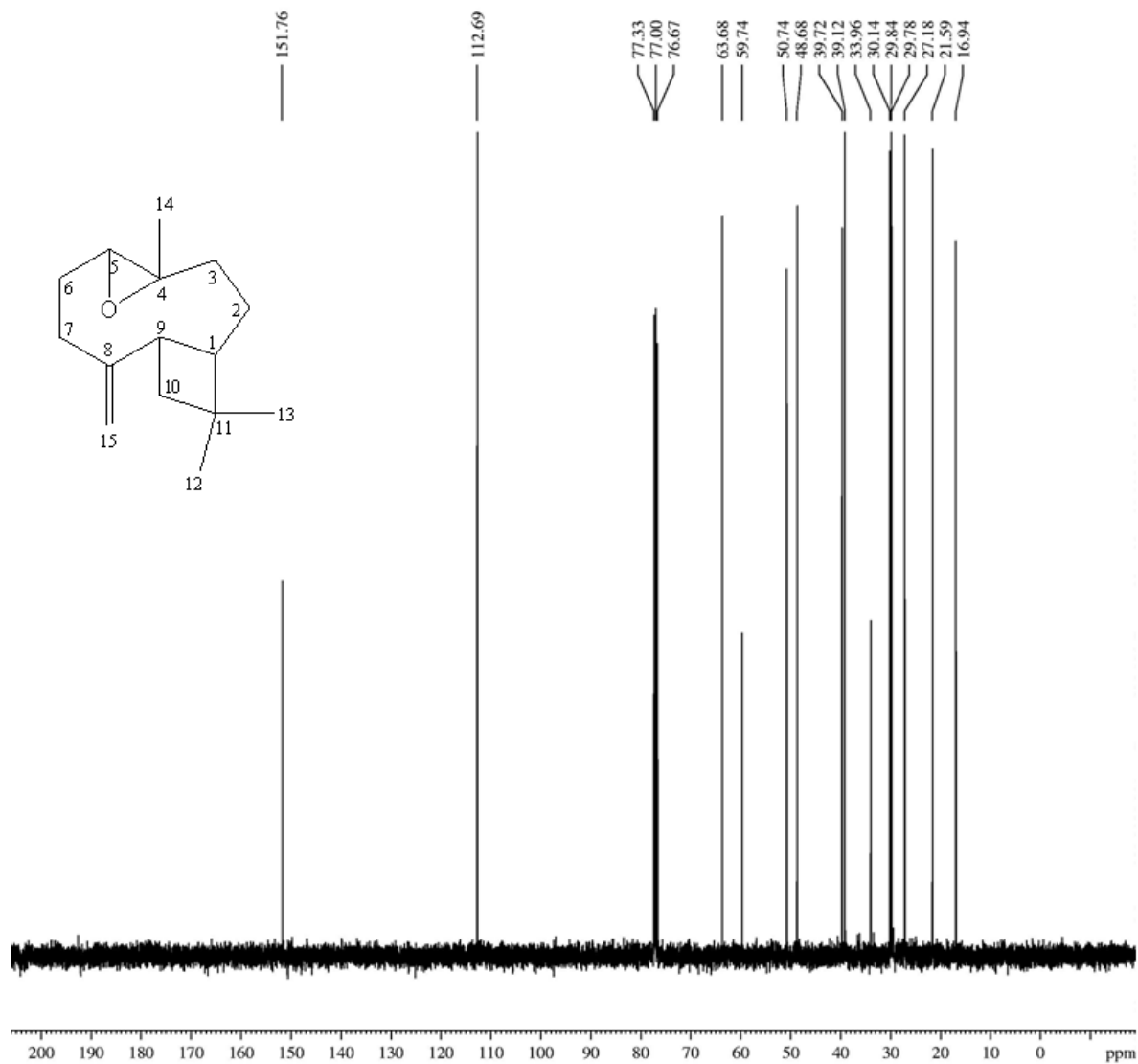
ANEXO 7: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT da *E*-(-)-pinocanfona (100 MHz, CDCl_3).

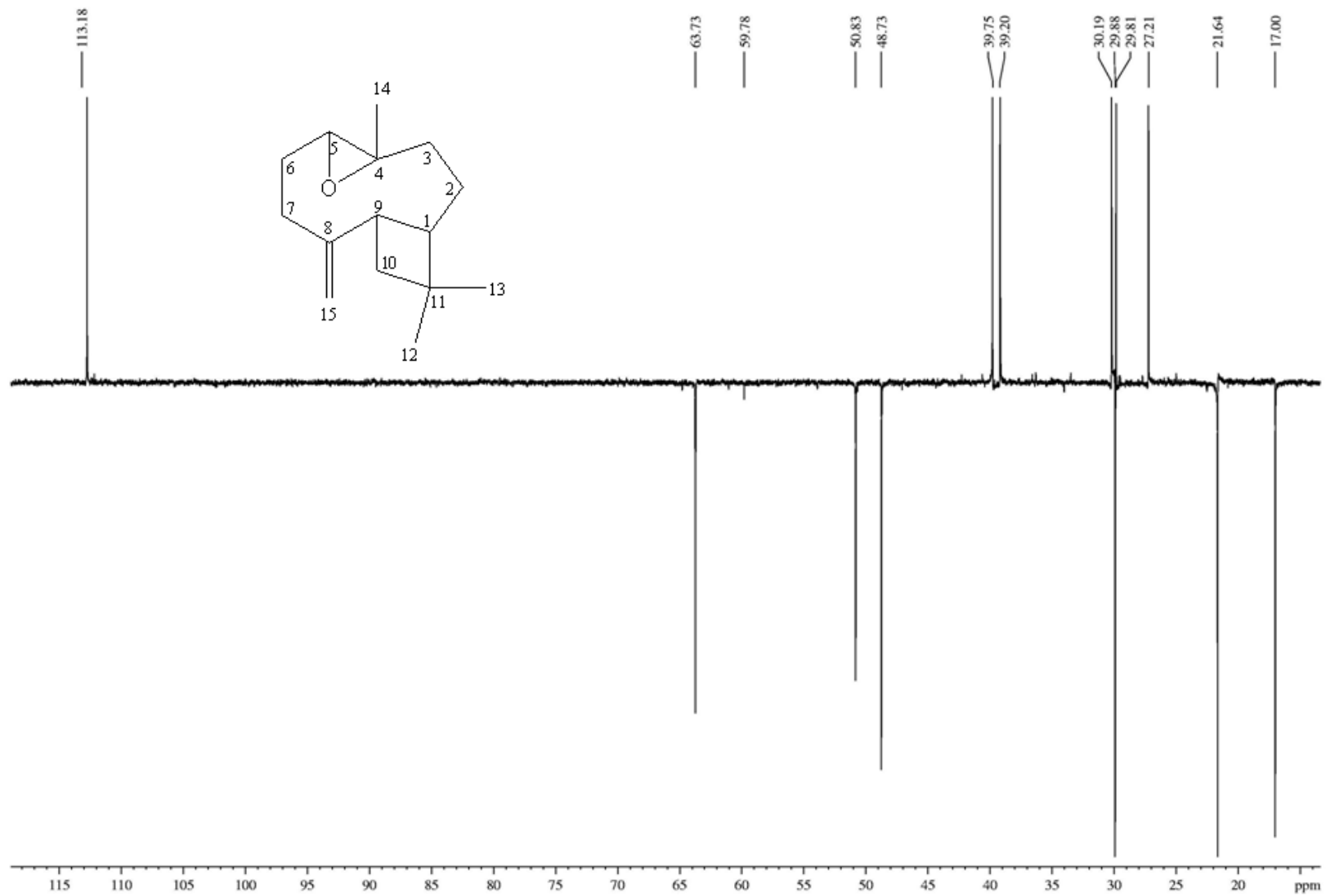


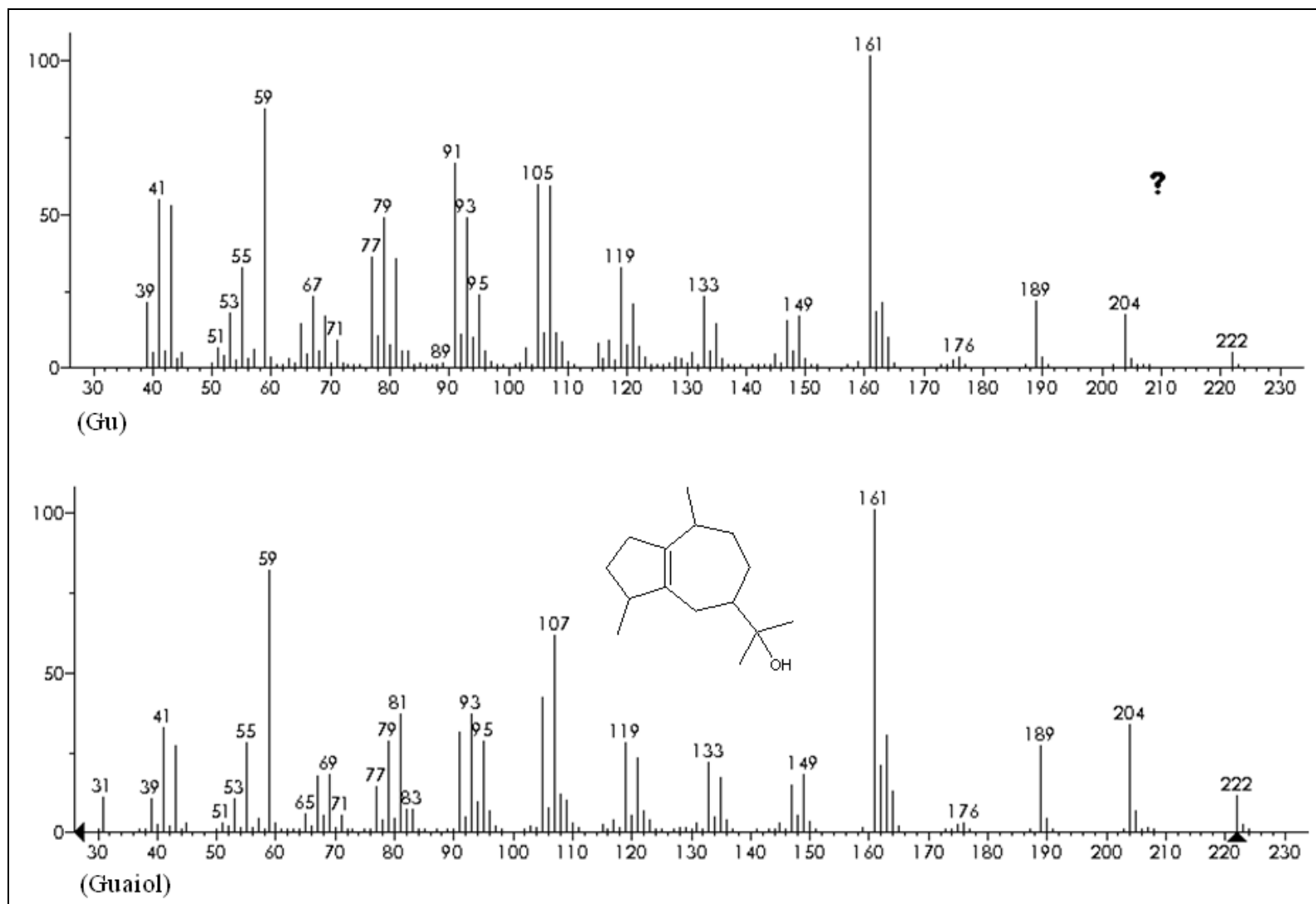
ANEXO 8: Espectro de massas do (-)-óxido de cariofileno (NIST, 2002).

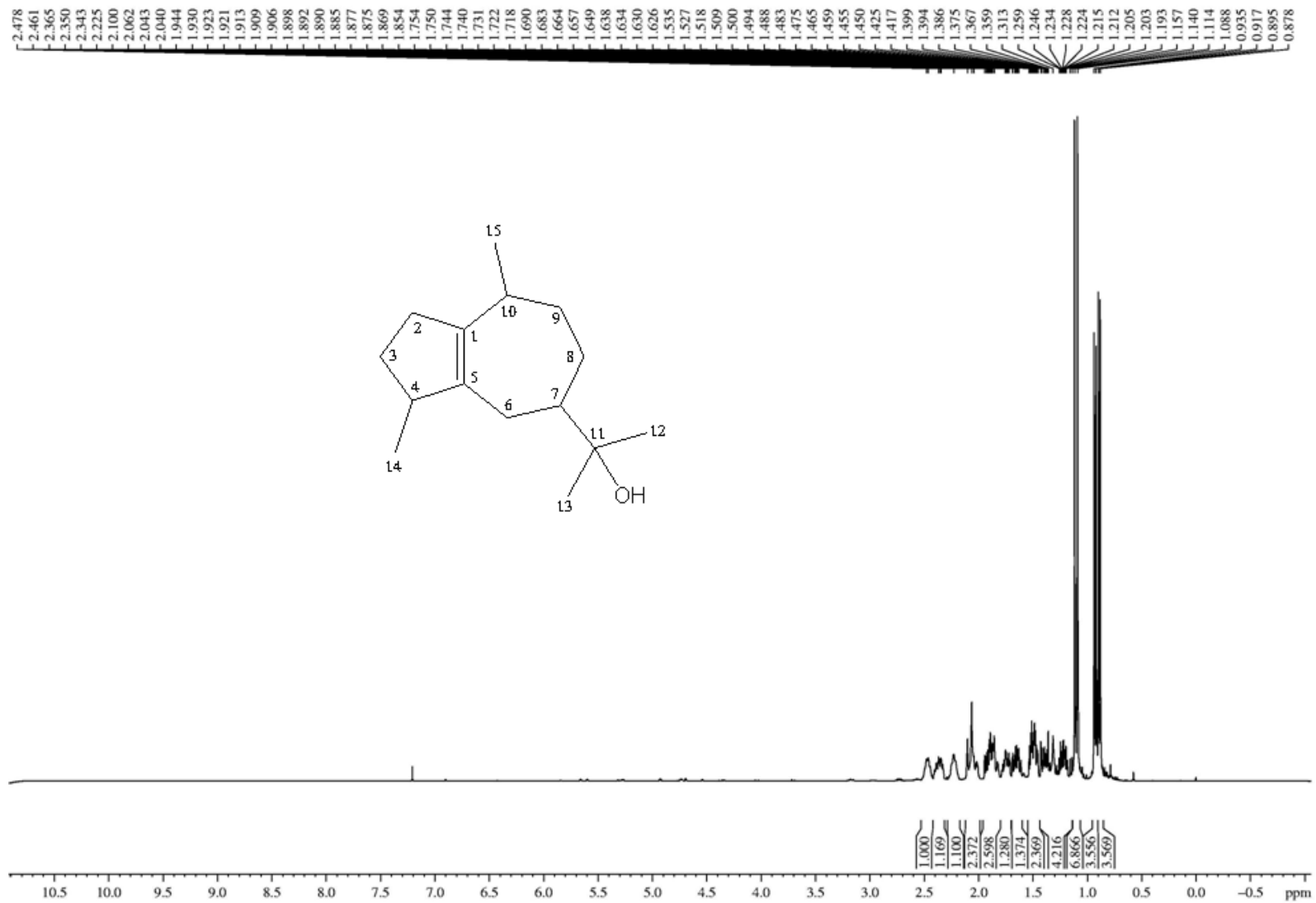
ANEXO 9: Espectro de RMN ^1H do (-)-óxido de cariofileno (400 MHz, CDCl_3).

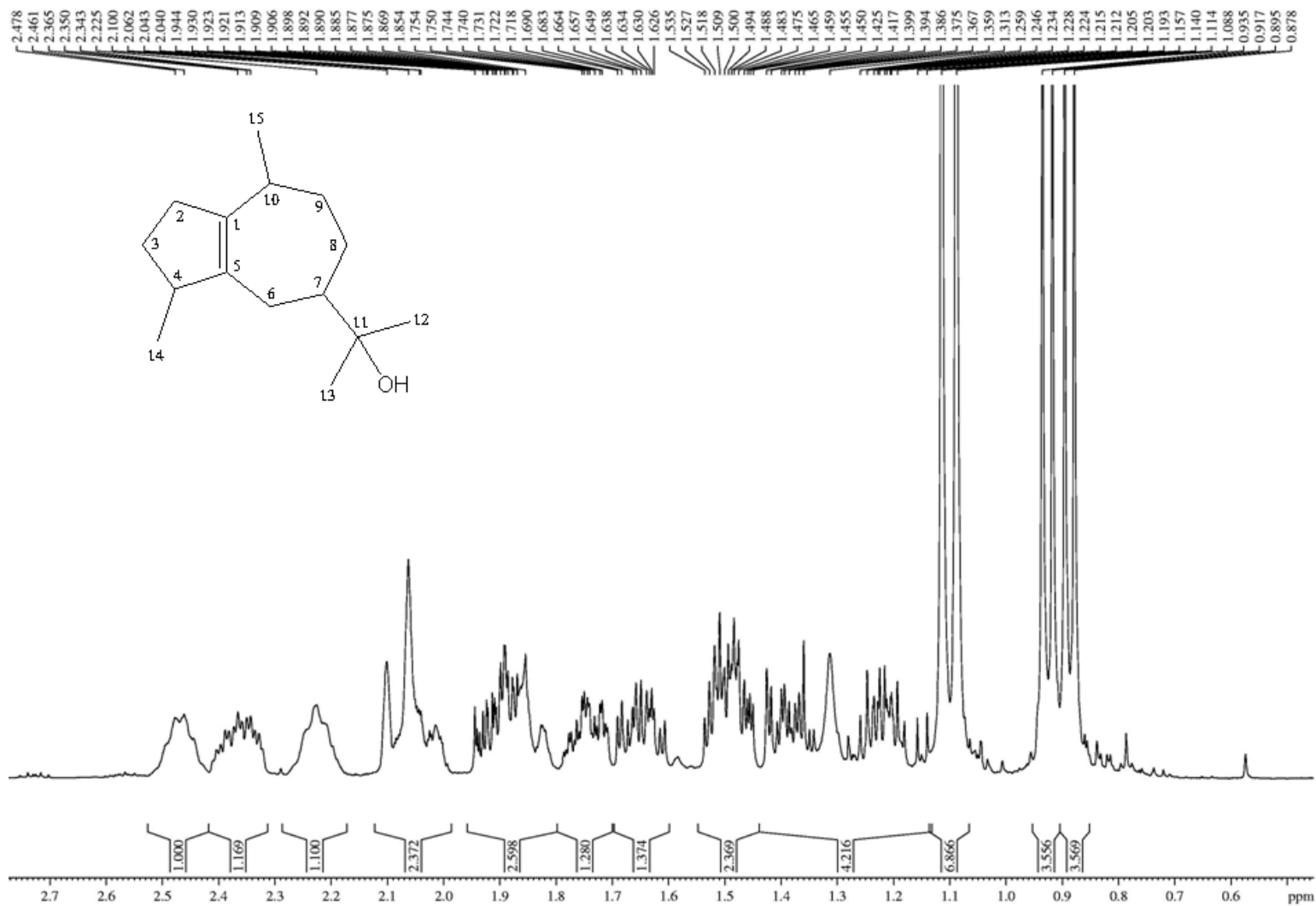
ANEXO 10: Ampliação do espectro de RMN ^1H do (-)-óxido de cariofileno (400 MHz, CDCl_3).

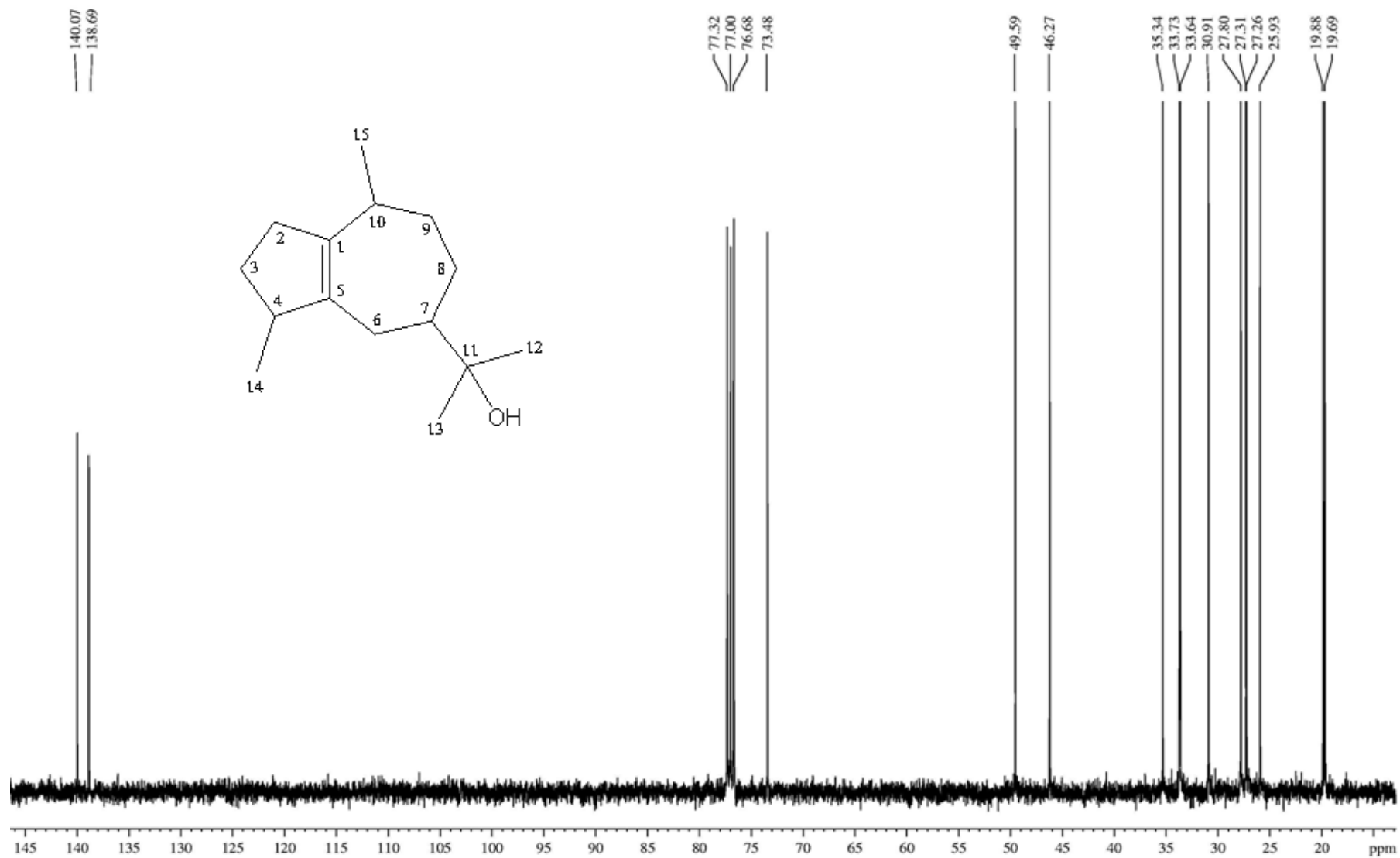
ANEXO 11: Espectro de RMN ^{13}C do (-)-óxido de cariofileno (100 MHz, CDCl_3).

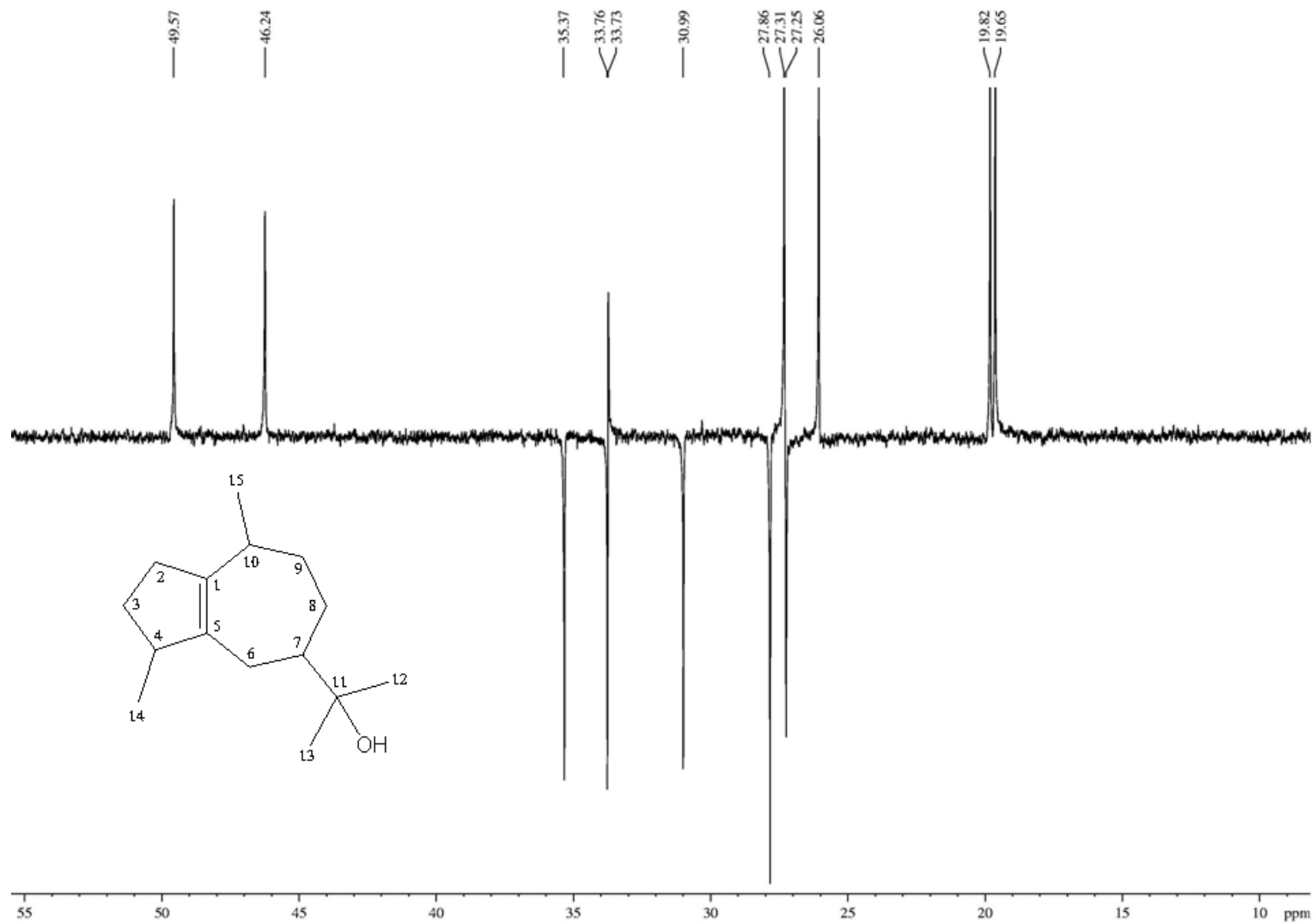
ANEXO 12: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT do (-)-óxido de cariofileno (100 MHz, CDCl_3).

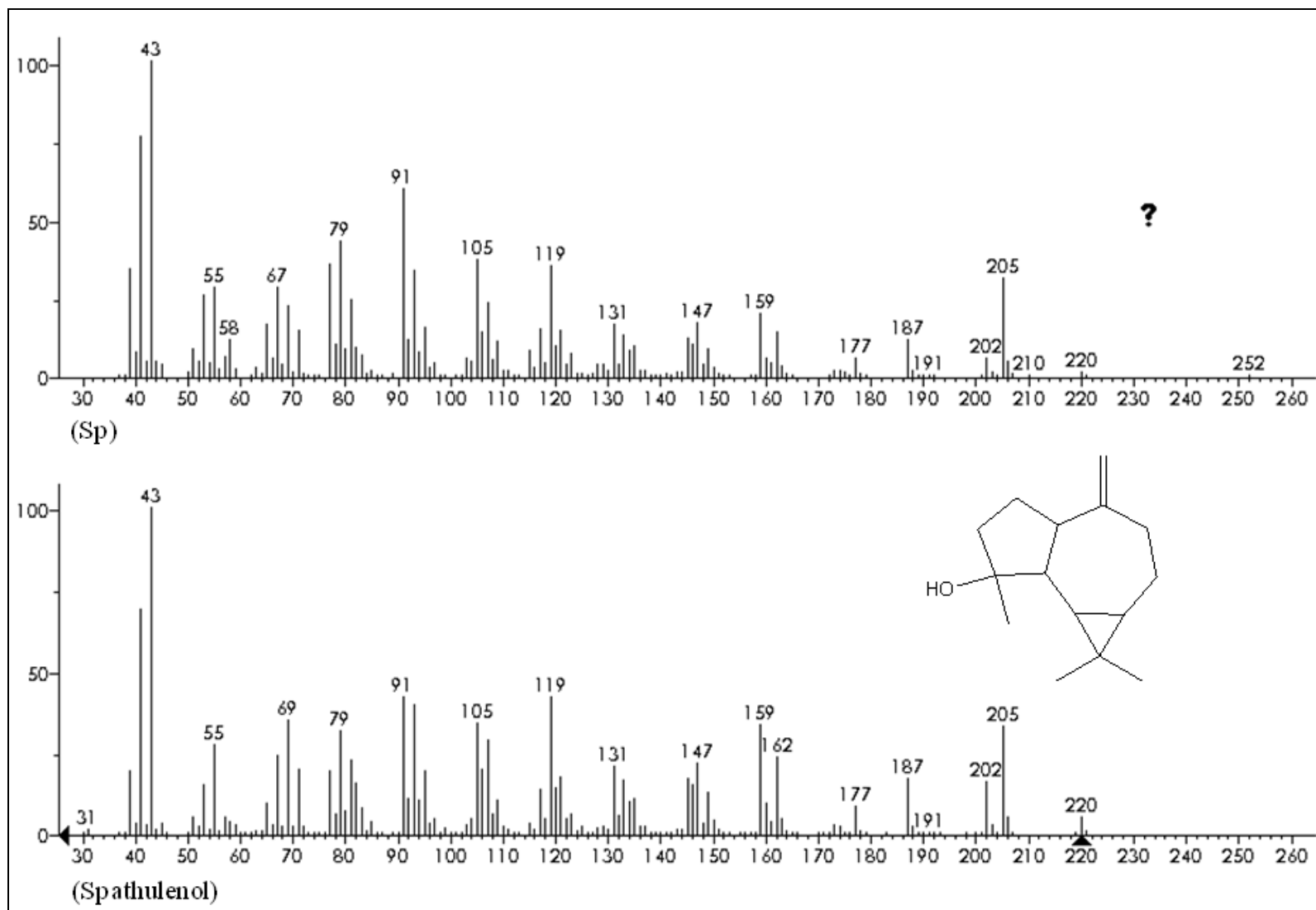
ANEXO 13: Espectro de massas do (-)-guaiol (NIST, 2002).

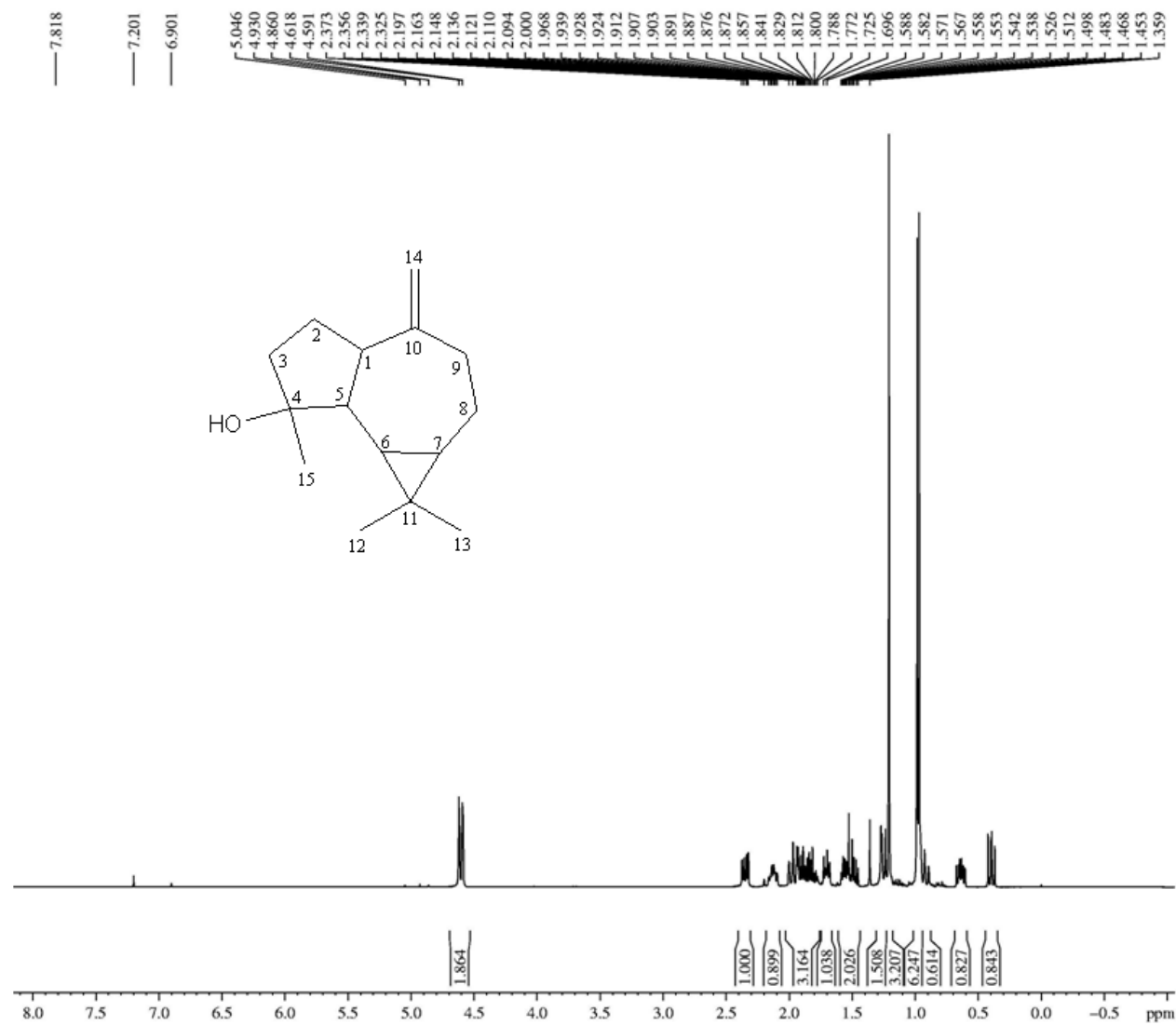
ANEXO 14: Espectro de RMN ^1H do (-)-guaiol (400 MHz, CDCl_3).

ANEXO 15: Ampliação do espectro de RMN ^1H do (-)-guaiol (400 MHz, CDCl_3).

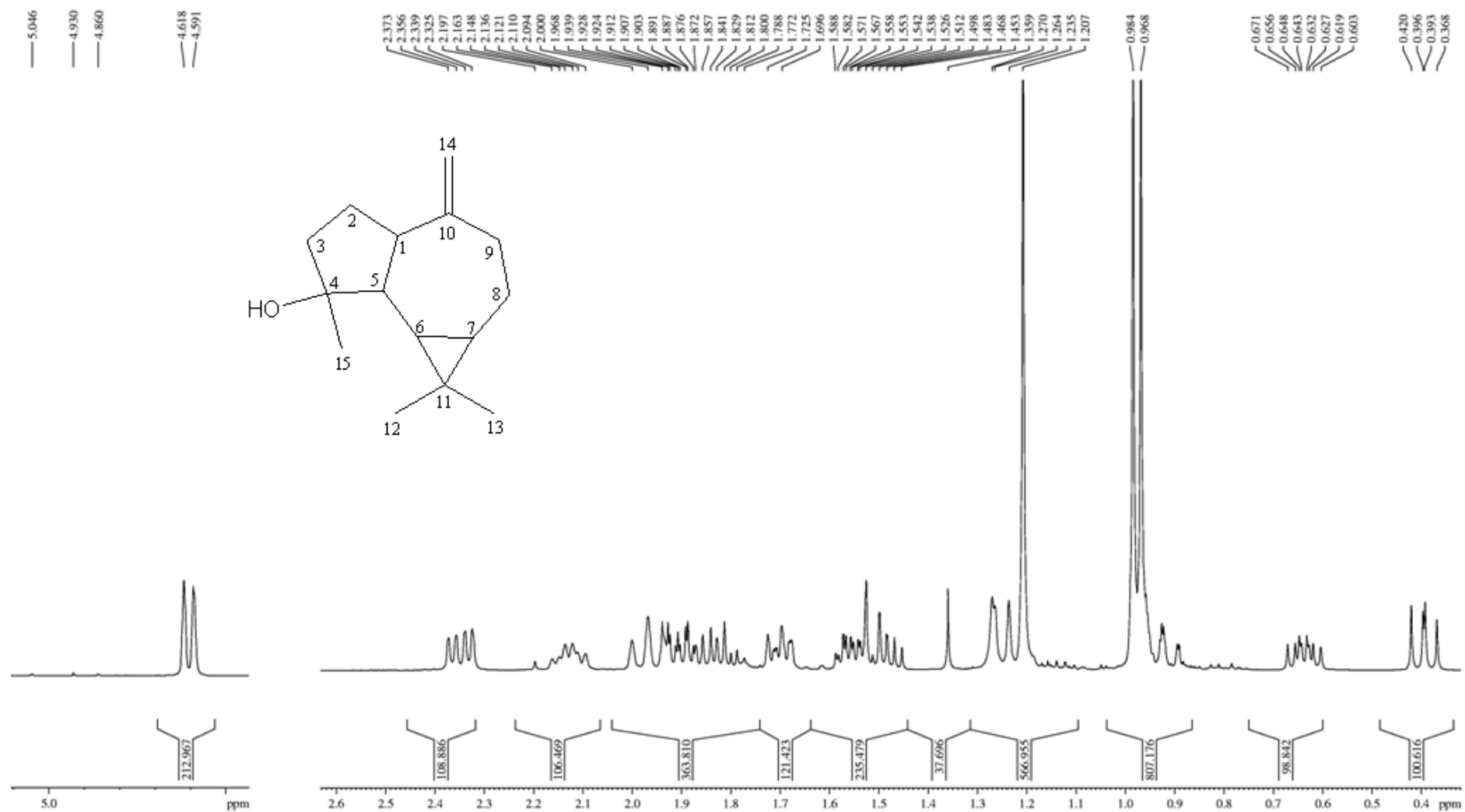
ANEXO 16: Espectro de RMN ^{13}C do (-)-guaiol (100 MHz, CDCl_3).

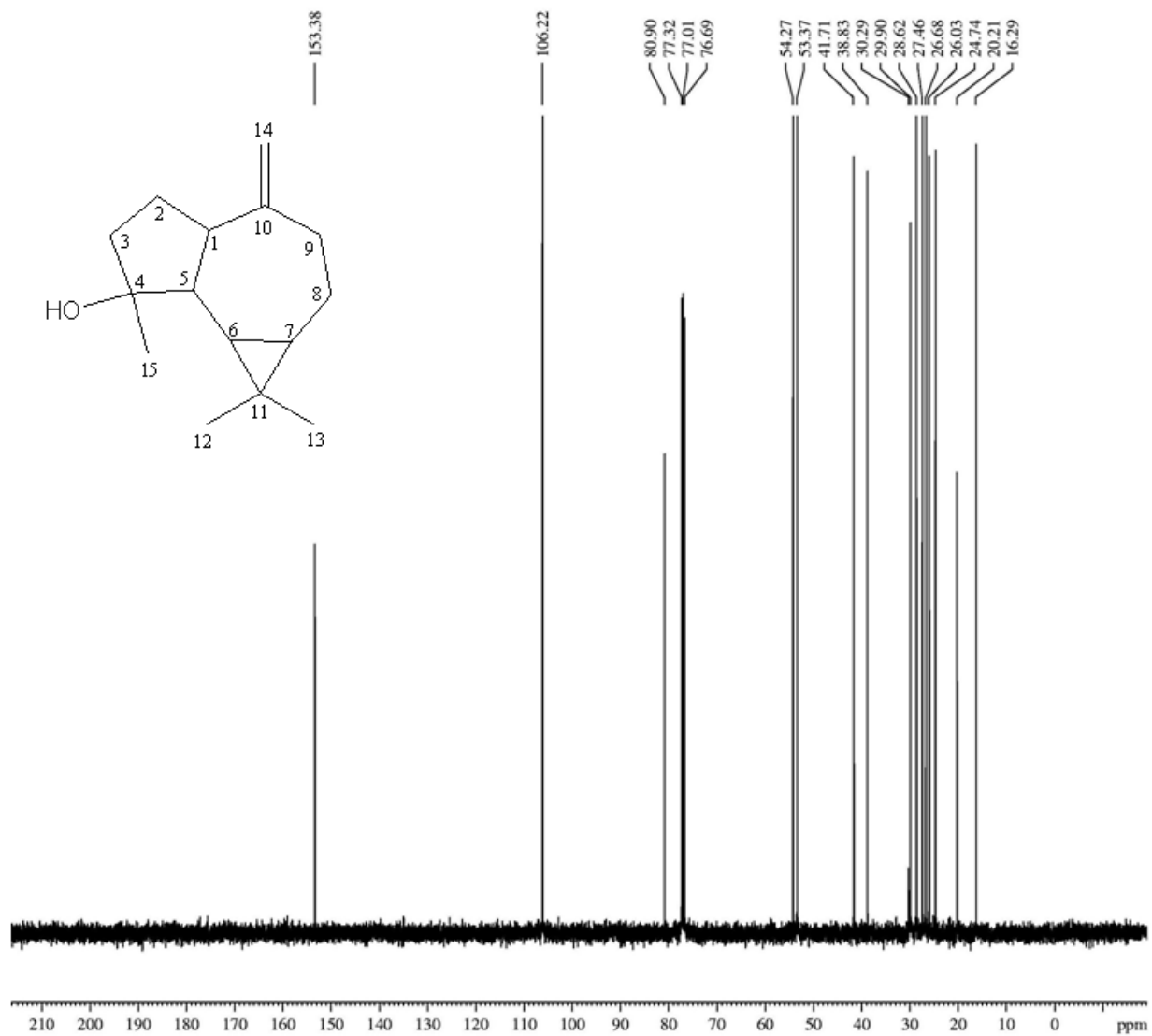
ANEXO 17: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT do (-)-guaiol (100 MHz, CDCl_3).

ANEXO 18: Espectro de massas do (+)-espatulenol (NIST, 2002).

ANEXO 19: Espectro de RMN ^1H do (+)-espatulenol (400 MHz, CDCl_3).

ANEXO 20: Ampliação do espectro de RMN ^1H do (+)-espatulenol (400 MHz, CDCl_3).



ANEXO 21: Espectro de RMN ^{13}C do (+)-espatulenol (100 MHz, CDCl_3).

ANEXO 22: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT do (+)-espatulenol (100 MHz, CDCl_3).