

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown  
como anestésico para peixes**

**TESE DE DOUTORADO**

**Mauro Alves da Cunha**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**



**Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como  
anestésico para peixes**

**Por**

**Mauro Alves da Cunha**

Tese apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Zootecnia (Doutorado) –  
Área de Concentração Produção Animal/ Fisiologia de peixes,  
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil  
2011

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como anestésico e  
antibacteriano para peixes**

elaborada por  
**Mauro Alves da Cunha**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

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

**Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dr. (UFSM)**

**Berta Maria Heinzmann, Dr. (UFSM)**

**Levy de Carvalho Gomes, Dr. (UVV)**

**Maria Amália Pavanato, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 14 de janeiro de 2011

## DEDICATÓRIA

À minha esposa Carla,

“Pelo amor, incentivo, apoio, companheirismo e suporte emocional, além dos sacrifícios e concessões”

A minha filha Bibiana,

“Com o meu amor e como incentivo para a sua vida”

Aos meus amigos,

“São pessoas tão queridas e especiais, que seria impossível ter feito alguma coisa sem eles”.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus avós pelo incentivo ao estudo e pelos ensinamentos herdados...

Ao Professor Bernardo Baldisserotto, pela orientação com sabedoria, pelo convívio, dedicação, interesse e amizade no decorrer de todos estes anos.

Ao amigo Luciano de Oliveira Garcia, pela amizade, ombro amigo, convívio e paciência, e pelo auxílio na condução dos experimentos referentes à Tese.

Aos funcionários do Departamento Fisiologia e Farmacologia e do departamento de Zootecnia, pela disponibilidade e auxílios durante a jornada acadêmica.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Departamento de Zootecnia da UFSM, pela oportunidade da realização do Curso de Pós-graduação.

A CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

A Deus por tudo que alcançamos.

Em ti... parte de mim...  
Quando me olha... me ganha...  
E quando chora...choro também!

Pequena dominadora...  
Aos teus dengos me entrego...  
Meus não para ti... são sempre sim!

Te embalo nos braços meus...  
Protegendo-te dos medos teus...  
Transformo-me num semi-Deus!

Bibiana, meu terno tesouro...  
Semente minha...  
Fruto de amor!!!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **Óleo essencial de *Lippia alba* como anestésico e antibacteriano para peixes**

AUTOR: Mauro Alves da Cunha  
ORIENTADOR: Bernardo Baldisserotto  
Santa Maria, 14 de janeiro de 2011.

Existem alguns anestésicos e antibacterianos efetivos para peixes, mas é importante buscar novas alternativas de substâncias de fácil aquisição e baixo custo aos piscicultores e que não ofereçam aos animais e manipuladores riscos à saúde. Portanto, este trabalho verificou a utilização do óleo essencial de *Lippia alba* (OE) como anestésico em jundiás (*Rhamdia quelen*) e em cavalos marinhos (*Hippocampus reidi*). Para identificar o tempo de indução e recuperação anestésica os peixes foram colocados em aquários com 1 L de água contendo diferentes concentrações do OE, e após a indução, foram transferidos para aquários livres do OE para avaliar o tempo de recuperação. Foi realizada coleta de sangue dos peixes para análise de cortisol plasmático (jundiá) e glicose sanguínea (cavalo marinho). Em jundiás o sangue foi coletado 0, 1 e 4 h após anestesia e exposição ao ar e alguns exemplares do tempo 0 h foram abatidos para testes de avaliação sensorial do filé. Nos cavalos marinhos o sangue foi coletado antes e após transporte realizado por 4 ou 24 horas. Os resultados obtidos mostraram que o OE é uma alternativa segura como anestésico para o jundiá na concentração de 100 a 500 mg L<sup>-1</sup>, pois reduz o cortisol plasmático no momento da exposição ao ar e não deixa odor ou sabor desagradável ao filé. Em cavalos marinhos este OE mostrou-se efetivo para sedação (10-20 µL L<sup>-1</sup>) e para anestesia profunda (50-450 µL L<sup>-1</sup>). Além disso, 15 µL L<sup>-1</sup> do OE na água do transporte inibe a elevação da glicose sanguínea e conseqüentemente seu uso no transporte desta espécie é sugerido.

Palavras chave: *Rhamdia quelen*, *Hippocampus reidi*, anestesia, transporte, estresse.



## ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree  
Post-Graduate in Animal Husbandry  
Universidade Federal de Santa Maria

Essential oil of *Lippia alba* as anaesthetic and antibacterial for fish

Author: Mauro Alves da Cunha  
Adviser: Bernardo Baldisserotto  
January 14<sup>rd</sup>, 2007, Santa Maria

There are some effective anesthetics and antibacterial for fishes, but it is important to search new alternatives of substances easily obtained, of low cost for fish farmers and with no risk to fish and human health. Therefore, this study analyzed the use of essential oil (EO) of *Lippia alba* as anesthetics, in silver catfish (*Rhamdia quelen*) and slender seahorse (*Hippocampus reidi*). To identify time of induction and anesthesia recovery, the fishes were placed in aquaria containing different concentrations of EO and after induction, fish were transferred to anesthetic-free aquaria to evaluate recovery time. Blood collect of the fish for analysis of plasma cortisol (silver catfish) and Blood glucose levels (seahorse). In silver catfish blood was collected 0, 1 and 4 h after anesthesia and air exposure and some epecimens were killed at time 0h for sensorial evaluation of the fillet. In slender seahorses blood was collected begin and after the transport of the 4 our 24 h. The results obtained showed that the EO could be used at concentrations ranging from 100 to 500 mg L<sup>-1</sup> to induce anesthesia (stage 4) in silver catfish, as it reduces plasma cortisol when the fish is exposed to air, and does not modify the odor and the flavor of the fillet. In seahorses this EO is effective to induce slight sedation in slender seahorse at 10-20 µL L<sup>-1</sup> and deep anesthesia at 50-450 µL L<sup>-1</sup>. Furthermore, 15 µL L<sup>-1</sup> of EO in the water of transport inhibits elevation of blood glucose and neutrophils and lymphocytes decrease in slender seahorse, and therefore its use in the transport of this species is suggested.

Key Words: *Rhamdia quelen*, *Hippocampus reidi*, transport stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	Exemplares de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown cultivados no Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), fotografada em 14 de maio de 2007 ...	14
<b>FIGURA 2</b>	Jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy and Gaimard 1824) .....	15
<b>FIGURA 3</b>	Cavalo marinho ( <i>Hippocampus reidi</i> ), exemplar de aproximadamente 2,5 g e 10 cm, utilizado nos testes de indução anestésica realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Universidade de Vila Velha, Vila Velha – ES, fotografado em 10 de novembro de 2008 ...	16
<b>FIGURA 4</b>	Esquema dos efeitos primários e secundários do estresse em peixes (FONTE: MAZEAUD et al., 1977) .....	22
<b>CAPÍTULO 1</b>		
<b>FIGURA 1</b>	Effect of the essential oil of <i>Lippia alba</i> (300 mg L <sup>-1</sup> ) on plasma cortisol levels in silver catfish that were exposed to air for 1 min. N = 8.....	45
<b>CAPÍTULO 2</b>		
<b>FIGURA 1</b>	Blood glucose levels of seahorses transported in plastic bags (one seahorse for bag) for 4 or 24 h. n= 10 .....	68

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>TABELA 1</b>	Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of <i>Lippia alba</i> in silver catfish juveniles. Stages according to Schoettger and Julin (1967). Maximum observation time was 30 min. Time to reach each stage in seconds (s). N = 20 for each concentration tested.....	43
-----------------	--	----

### CAPÍTULO 2

<b>TABELA 1</b>	Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of <i>Lippia alba</i> in slender seahorse juveniles. Stages according to Schoettger & Julin (1967). Maximum observation time was 45 min. Time to reach each stage in seconds (s). n = 10 for each concentration tested.....	65
<b>TABELA 2</b>	Hematological parameters (%) of slender seahorse transported in plastic bags with the essential oil of <i>L. alba</i> (15mg L <sup>-1</sup> ). n= 10 for each treatment tested .....	66

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.2 Objetivos.....	17
1.2.1 Objetivos gerais .....	17
1.2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 Anestésicos derivados de plantas</b> .....	18
<b>2.2 Estresse, cortisol e glicose</b> .....	20
<b>2.3 Análise sensorial</b> .....	23
<b>2.4 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)</b> .....	24
<b>2.5 Cavalo marinho (<i>Hippocampus reidi</i>)</b> .....	24
<b>Capítulo 1 - Essential oil of <i>Lippia alba</i>: a new anesthetic for silver catfish, <i>Rhamdia quelen</i></b> .....	26
<b>Capítulo 2 - Anesthetic induction and recovery of <i>Hippocampus reidi</i> exposed to the essential oil of <i>Lippia alba</i></b> .....	47
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

Algumas práticas realizadas na aquicultura como biometria, análises patológicas, implantes hormonais e transporte freqüentemente expõem peixes a uma variedade de fatores estressantes que podem afetar seu desempenho (BARTON, 2000). O conhecimento de métodos que permitam intervenções com o mínimo de danos às funções vitais e fisiológicas dos peixes é importante para que a mortalidade e o estresse sejam mínimos durante o transporte e o manejo. Deve-se também considerar que fatores estressantes induzem uma queda da imunidade nos peixes, possibilitando que bactérias oportunistas causem danos a sua saúde, podendo inclusive levar à morte.

O uso de anestésicos no manejo de peixes foi iniciado a partir de observações dos indígenas americanos, que colocavam rotenona (*Derris elliptica*) para sedar e capturar os peixes na natureza (GIMBO, 2008). Vários anestésicos químicos como a tricaína metano sulfonato (MS 222), o sulfato de quinaldina, a benzocaína e o fenoxietanol são usados extensamente, mas podem causar perda de muco, irritação da brânquia e danos na córnea (INOUE et al., 2003), podendo ocorrer também danos aos manipuladores e ao meio ambiente. Neste sentido a busca por anestésicos de origem natural, com baixa ou nenhuma toxicidade, viabilidade econômica, praticidade no uso e eficácia tem sido alvo de muitas pesquisas. Façanha e Gomes (2005) relatam que o uso de óleos essenciais como anestésicos para peixes parece ser uma alternativa viável frente ao alto custo e dificuldades de obtenção dos produtos químicos utilizados para esta finalidade.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de pequenos arbustos. As espécies são encontradas em todos os países da América do Sul e Central e territórios tropicais da África (TERBLANCHE e KORNELIUS, 1996). Atividades sedativa e miorelaxante de *L. alba* (Figura 1), espécie utilizada pelas propriedades sedativas na medicina popular, já foram descritas em roedores (VALE et al., 1999; ZÉTOLA et al., 2002). Preparações com outras espécies do mesmo gênero foram patenteadas para o tratamento de doenças crônicas e/ou inflamatórias (N° da patente N° WO2005058338) e para a inibição da angiogênese (N° da patente DE10047835).

Diversas espécies de *Lippia* têm sido utilizadas para tratamento de doenças respiratórias como gripe, bronquite e asma, demonstrando efeito frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras (PASCUAL et al., 2001). Os autores relatam ainda atividades analgésica, antiinflamatória, antipirética, sedativa, anti-diarréica, anti-espasmódica e ainda como tempero ou condimento na culinária.



Figura 1 – Exemplos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown *Lippia alba* cultivados no Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), fotografados em 14 de maio de 2007.

A glicose plasmática desempenha importante papel no metabolismo de peixes, sendo um dos indicadores mais utilizados, juntamente com o cortisol, para diagnosticar a ocorrência de estresse fisiológico (WEDEMEYER et al., 1990). Em matrinxã (*Brycon amazonicus*), o uso de benzocaína na água dos tanques de transporte aumentou os níveis de cortisol plasmático, concluindo que a benzocaína não diminuiu a resposta fisiológica ao estresse do transporte. Além do mais, variações mínimas na dose desse anestésico provocaram grandes alterações na

glicose sangüínea e glicogênio hepático, sugerindo cuidado no uso desse anestésico para prevenir a morte ou injúria física pelo uso de concentrações inadequadas (CARNEIRO et al., 2002).

Neste trabalho, foram utilizados o jundiá (*Rhamdia quelen*) e o cavalo marinho (*Hippocampus reidi*). O jundiá (Figura 2) é uma espécie rústica comumente encontrada em cursos de água no sul do Brasil e com bons resultados em condições de cativeiro e excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para a alimentação. Portanto, dados referentes ao comportamento de jundiás expostos a diferentes anestésicos podem contribuir para o melhor manejo desses animais e o crescimento da piscicultura nacional. Nesta espécie há apenas estudos com benzocaína (SEIGNEUR, 1984) e com eugenol (óleo de cravo) (CUNHA et al., prelo).



Figura 2- Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard 1824).

O cavalo marinho *H. reidi* (Figura 3) é uma das espécies de peixes ornamentais mais exportadas pelo Brasil (MONTEIRO-NETO et al., 2003). Esta espécie é utilizada na medicina popular, como souvenir e propósitos religiosos (ROSA et al., 2002, 2005). A produção brasileira é exportada geralmente para os Estados Unidos, Ásia e Europa. A mortalidade ocorre geralmente durante o transporte ou dentro de algumas semanas após a chegada no destino como uma resposta fisiológica atrasada ao estresse de coleta, manejo e transporte (KOLDEWEY et al., 2005). Buscou-se então identificar os tempos de indução e

recuperação anestésicas no cavalo marinho expostos ao óleo essencial (OE) de *L. alba*, assim como a eficácia do OE como um agente de diminuição do estresse no transporte desta espécie. Este foi o primeiro estudo que trata do transporte do cavalo marinho.



Figura 3 - Cavalo marinho (*Hippocampus reidi*), exemplar de aproximadamente 2,5 g e 10 cm, utilizado nos testes de indução anestésica, realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Universidade de Vila Velha, Vila Velha – ES, fotografado em 10 de novembro de 2008.



### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivos gerais

Obtenção das concentrações do OE de *L. alba* (Mill.) N. E. Brown a serem utilizadas em anestesia e transporte de peixes, verificando também seu efeito em indicadores fisiológicos de estresse. Realizar testes de análise sensorial na carne dos peixes tratados com OE de *L. alba*.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

Verificar o tempo e a concentração necessária para indução e recuperação anestésica de jundiás e cavalos marinhos,

Verificar a concentração necessária para realizar o transporte de jundiás e cavalos marinhos,

Verificar o efeito do OE de *L. alba* sobre glicose e cortisol sanguíneos para analisar sua ação na resposta ao estresse.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A anestesia é um processo reversível que provoca perda de sensação de todo ou em parte do corpo e que resulta em depressão da função nervosa, causada por um fármaco. Os anestésicos são agentes químicos ou físicos, que com o aumento da exposição ou concentração, primeiro acalmam (sedam) um animal e depois causam perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e finalmente, das reações reflexas por evitarem o início e condução do impulso nervoso (SUMMERFELT & SMITH, 1990).

A avaliação dos diferentes estágios de anestesia que um anestésico para peixes pode induzir é bastante subjetiva e muitas vezes é difícil diferenciar o momento da passagem de um estágio de anestesia para outro (GILDERHUS & MARKING, 1987). Essa avaliação depende de uma série de fatores, como habilidade do manipulador dos peixes, dos procedimentos a serem realizados e de outros parâmetros (BURKA et al., 1997). Claramente deve-se também considerar fatores biológicos e ambientais ao administrar ou ao comparar estudos referentes ao uso dos anestésicos (BURKA et al., 1997; ROSS & ROSS, 2008). Os fatores biológicos incluem a espécie, idade, tamanho, peso, condições fisiológicas e presença ou não de parasitas e doenças. Todos estes afetam a taxa metabólica e conseqüentemente a farmacocinética dos compostos do anestésico. Os fatores ambientais como a temperatura e o pH também afetam o metabolismo dos peixes, e conseqüentemente aumentam ou diminuem a eficácia de um anestésico (BURKA et al., 1997; ROSS & ROSS, 1999).

### **2.1 Anestésicos derivados de plantas**

O uso de anestésicos na piscicultura tem sido uma alternativa para reduzir o estresse e a mortalidade no manejo de peixes, e seu emprego tem aumentado nos últimos tempos. Vários estudos descrevem a utilização de diferentes agentes indutores de anestesia, dentre eles encontramos produtos químicos, sendo os mais comuns o metanosulfato de tricaina (MS222), a quinaldina e o 2-fenoxietanol

(MGBENKA & EJIOFOR, 1998; ROSS & ROSS, 2008). Porém, o alto custo destes produtos e dificuldades de importação dificultam seu uso (ROUBACH et al., 2005). O único anestésico químico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em peixes é o MS222, o qual não é produzido no Brasil (FAÇANHA e GOMES, 2005). Deste modo, tem-se buscado outras alternativas para anestesia de peixes, como óleos essenciais de diferentes plantas como o óleo de cravo, o mentol e constituintes isolados destes..

O mentol, segundo Matos (2000), é extraído de óleos essenciais da planta menta (*Mentha arvensis* L.), conhecida também como hortelã (LORENZO et al., 2002). É de fácil aquisição, pois pode ser encontrado em farmácias de manipulação, além de ser de fácil utilização e conforto ao aplicador. A melhor concentração para uma anestesia cirúrgica em tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi 150 mg/L, pois o tempo de indução é rápido, porém, a recuperação é significativamente mais demorada que para as menores concentrações testadas. Para uma anestesia, com finalidade de biometria, a melhor concentração é 100 mg/L (FAÇANHA & GOMES, 2005).

O óleo de cravo é um anestésico derivado da destilação de partes da planta do gênero *Eugenia*, e tem como princípio ativo o eugenol, um depressor do sistema nervoso central (ANDERSON et al., 1997). O óleo de cravo ou o eugenol já foram testados como anestésicos em várias espécies brasileiras como tambaqui (ROUBACH et al., 2005), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (GONÇALVES et al., 2008), lambari (*Astyanax bimaculatus*) (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2009), jundiá (*Rhamdia quelen*) (CUNHA et al., prelo), dourado (*Salminus brasiliensis*) (HISANO et al., 2008, PÁDUA et al., 2009), surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) (VIDAL et al., 2006), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) (VIDAL et al., 2007a), matrinxã (*Brycon cephalus*) (INOUE et al., 2003, 2005; VIDAL et al., 2007b), e pirarucu (*Arapaima gigas*) (HONCZARYK & INOUE, 2009)

Alguns estudos compararam os efeitos fisiológicos dos anestésicos naturais contra os de anestésicos convencionais, e verificaram que, por exemplo, o óleo de cravo tem efeito semelhante ao do MS 222 e causa perturbações fisiológicas mínimas frente a fatores estressantes externos (CHO & HEATH, 2000; SLADKY et al., 2001; WAGNER et al., 2003). Como substituto da benzocaína em anestesia de peixes, foram testados o mentol e o eugenol. Os resultados obtidos mostraram que ambos são anestésicos eficientes para pacus em substituição à benzocaína,

sugerindo-se as concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup> de mentol e 50 mg L<sup>-1</sup> de eugenol (GONÇALVES et al., 2008).

Uma combinação de eugenol e mentol foi testada para diminuir o estresse de manejo em *Macrobrachium rosenbergii*, os camarões foram expostos a diferentes concentrações (100, 200, 300 e 400 µL/ L) individualmente e também à combinação de ambos (eugenol e mentol). Os resultados indicam que uma combinação de eugenol e de mentol é útil para abrandar o estresse de manipulação no *M. rosenbergii* adulto (SAYDMOHAMMED & PAL 2009), e os autores relatam ainda que o eugenol e o mentol se acumulam nos tecidos, mas em 24 h ocorre a liberação destes resíduos e poderá ocorrer o consumo da carne dos camarões sem problemas aos humanos.

## 2.2 Estresse, cortisol e glicose

O conceito de estresse representa uma condição em que o animal é incapaz de manter um estado fisiológico normal devido a fatores chamados estressantes (ROSS & ROSS, 2008). Segundo Barton (2002), o estresse pode ser considerado como um conjunto de respostas não específicas do organismo a situações que ameaçam desequilibrar a sua homeostase. Os agentes de estresse ou estressores em peixes podem ser de inúmeros tipos:

Natureza física: transporte, o confinamento ou manuseio.

Natureza química: contaminantes, o baixo teor de oxigênio ou pH da água (ácido ou alcalino).

Percebidos pelos peixes: presença de predadores.

O estresse fisiológico segue com o desencadeamento da Síndrome de Adaptação Geral, dividida em três respostas: primária, secundária e terciária (STAURNES et al., 1994; MOYLE & CECH, 1988). A resposta neuroendócrina, ou primária, é caracterizada por um significativo aumento dos hormônios corticosteróides (cortisol) e da concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que estimulam a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando os níveis de glicose no sangue, diminuição da proteína muscular, aumento do batimento cardíaco, marcando o início da resposta secundária. A resposta secundária é marcada por efeitos metabólicos como alterações na glicemia,

no ácido láctico e no glicogênio hepático e muscular, efeitos hematológicos como alterações no hematócrito e no número de linfócitos e ainda efeitos osmorregulatórios como alterações nas concentrações plasmáticas de cloro, sódio, proteínas e na osmolaridade do plasma. A resposta terciária é marcada pela diminuição da resistência dos peixes às doenças, pois existe uma diminuição no número de leucócitos, ocorrendo linfocitopenia (diminuição do número de linfócitos) e neutrofilia (aumento do número de neutrófilos circulantes) (MAZEUAUD et al. 1977; WENDELAAR BONGA, 1997). As relações entre os efeitos primários e secundários relacionados ao estresse estão resumidas na Figura 4.

Muitos estudos descrevem o estresse em peixes através das elevações do cortisol e glicose plasmática em resposta a imposição de diversos estímulos adversos à homeostase. A influência do cortisol e as alterações na gliconeogênese e na glicogenólise são algumas das respostas ao estresse mais estudadas em peixes (DAVIS & GRIFFIN, 2003; SMALL, 2004; BARCELLOS et al., 2006). Seguido ao aumento do cortisol plasmático, observa-se o aumento dos níveis de glicose plasmática, que pode ser originária de diversos mecanismos metabólicos (MOMMSEN et al., 1999).

Nos peixes teleósteos a elevação do cortisol plasmático é reconhecida como a principal resposta hormonal ao estresse e pode ser utilizada como indicador de estresse (BARCELLOS et al., 2000; BARTON, 2002). No entanto, algumas substâncias tóxicas, prejudiciais à saúde dos peixes, não provocam alteração do cortisol plasmático, o que pode levar a uma conclusão equivocada de que o agente não cause estresse, outra situação adversa é sedação leve com MS222 (utilizado para reduzir a resposta ao estresse), nesta situação o MS222 provoca o aumento do cortisol plasmático semelhante a que ocorre em situações estressoras agudas, embora em altas concentrações (para anestesia profunda) não cause este tipo de resposta (BARTON & IWAMA, 1991; IVERSEN et al., 2003; WAGNER et al., 2003).

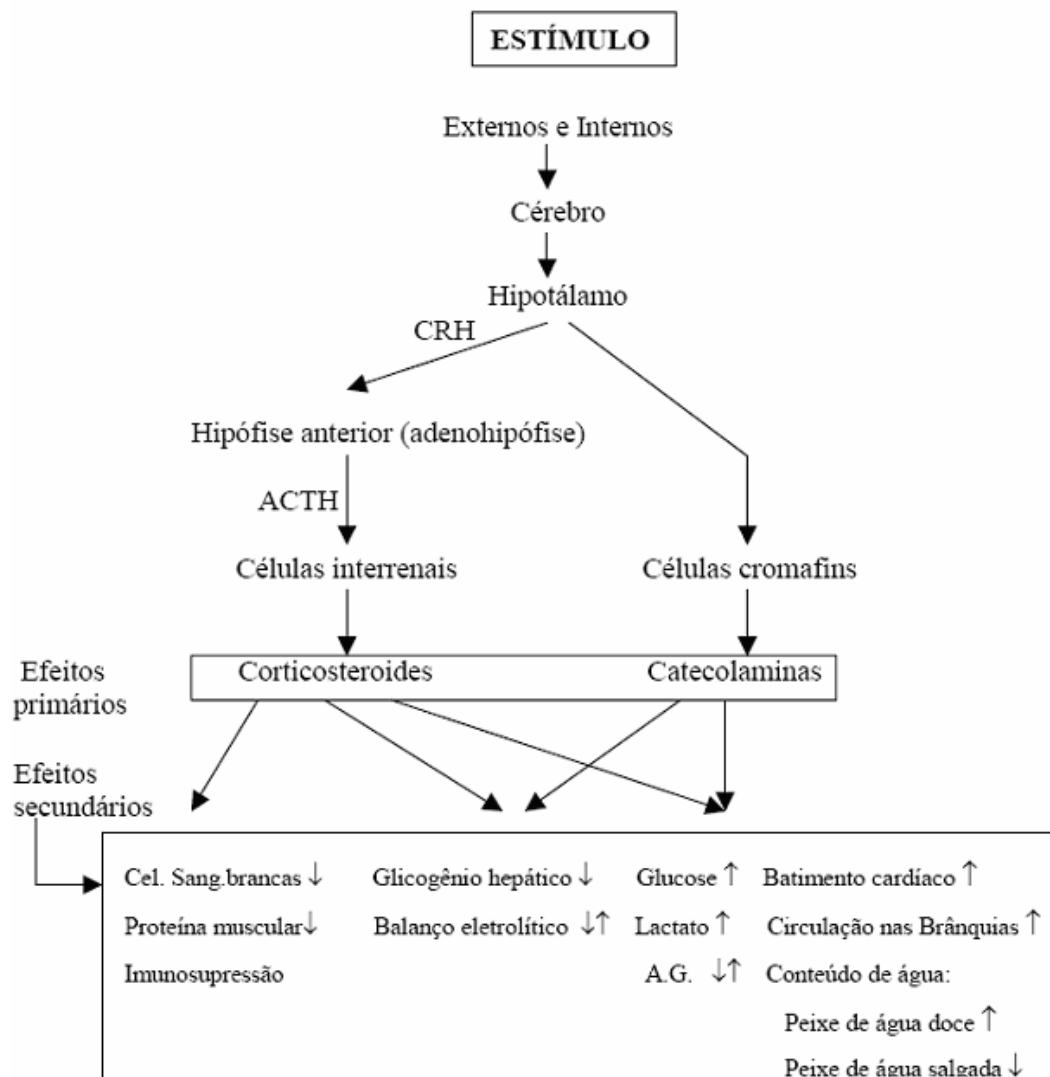


Figura 4- Esquema dos efeitos primários e secundários do estresse em peixes. A.G. ácidos graxos. (FONTE: MAZEAUD et al., 1977).

O aumento da glicose plasmática é conhecido como um bom indicador de estresse de peixes em condições de campo (HATTINGH, 1976; SILVEIRA et al., 2009), pois esta avaliação pode ser realizada no local da criação, com medidores de glicose de simples utilização e facilmente encontrados no mercado. O lactato também é um bom indicador de estresse, e indica o acúmulo de ácido láctico decorrente do aumento físico à medida que os animais são expostos a agentes estressores (SILVEIRA et al., 2009).

Os peixes em situação de estresse geralmente fazem uso de suas reservas hepáticas de glicogênio através da glicogenólise, disponibilizando energia para o organismo fugir ou se adaptar às novas condições ambientais (IWAMA et al., 1989; 2004). Estresse pode induzir o aumento de glicose sanguínea (BIRON & BENFEY, 1994; WENDELAAR-BONGA, 1997; BARCELLOS et al., 2003).

Anestésicos auxiliam na diminuição do estresse à medida que reduzem a atividade e o metabolismo dos peixes, reduzindo injúrias físicas, consumo de oxigênio e excreção de metabólitos tóxicos (BARCELLOS et al., 2000;). O uso de anestésicos diminui a liberação de cortisol em peixes submetidos a fatores estressantes (BARCELLOS et al., 2000, 2003; IVERSEN et al., 2003; GONÇALVES et al., 2008; SAYDMOHAMMED et al., 2009)

A capacidade do jundiá em responder a um estímulo de estresse agudo foi mantida para aqueles peixes estressados cronicamente. A similaridade na secreção do cortisol após um estresse agudo entre peixes estressados cronicamente e os não estressados sugere fortemente que a ocorrência de um período de estresse crônico não danifique a capacidade dos peixes em responder a um fator estressante agudo adicional (BARCELLOS et al., 2006).

### **2.3 Análise sensorial**

A análise sensorial é uma ciência interdisciplinar na qual se aplicam avaliadores, os quais utilizam uma complexa interação dos órgãos dos sentidos (visão, gosto, tato e audição) para mensurar as características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios e muitos outros materiais (WATTS et al., 1992). Os métodos sensoriais são baseados nas respostas aos estímulos, que produzem sensações cujas dimensões são intensidade, extensão, duração, qualidade e prazer ou desprazer. Enquanto os estímulos podem ser medidos por métodos físicos e químicos, as sensações são medidas por processos psicológicos.

A análise sensorial vem sendo aplicada no desenvolvimento e melhoramento de produtos, controle de qualidade, estudos sobre armazenamento e desenvolvimento de processos (MORAES, 1993). Lanzillotti & Lanzillotti (1999) descrevem ainda que a análise sensorial é timidamente empregada em alimentação coletiva na avaliação de preparações alimentares, como também auxiliando no

desenvolvimento de novos produtos. Os estudos utilizando a análise sensorial em piscicultura em sua maioria estão relacionados com controle de qualidade (CHABALIM & MENDONÇA, 1994; TAVARES et al., 1998) e tipos de processamento (RIBEIRO, 2000; SUEZILDE & TOBINAGA, 2002). Existem poucos trabalhos que realizaram análise sensorial dos filés de peixes que foram submetidos à anestesia. Ribas et al. (2007) verificaram que o óleo de cravo é um bom anestésico para o linguado *Solea senegalensis* porque assegura não somente um bom produto de boa qualidade final, em termos de odor, textura e coloração do filé, mas é igualmente aceitável para um consumo humano direto. No entanto, em filés de jundiás anestesiados com eugenol o sabor é desagradável, e não se indica a utilização deste anestésico se houver consumo imediato dos peixes após anestesia (CUNHA et al., prelo).

#### **2.4 Jundiá (*Rhamdia quelen*)**

O jundiá é uma espécie encontrada em quase toda a América do Sul e Central, tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul. A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde que foi descrita e a revisão de Silfvergrip (1996) já apresenta algumas contestações (BALDISSEROTTO, 2004). É a espécie nativa com maior presença na piscicultura continental no estado do Rio Grande do Sul, mas nos últimos anos sua produção caiu drasticamente de 7,6% para 1,5% do total (BALDISSEROTTO, 2009).

#### **2.5 Cavalo marinho (*Hippocampus reidi*)**

Existem 34 espécies de cavalos marinhos no mundo (PROJECT SEAHORSE, 2009). Esses peixes habitam preferencialmente áreas tropicais e subtropicais e a maior diversidade do grupo é encontrada no Indo-Pacífico (LOURIE et al., 1999). No litoral brasileiro ocorrem duas espécies: *Hippocampus erectus* Perry, 1810 e *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. *H. reidi* apresenta maior abundância (FIGUEIREDO & MENEZES, 1980; LOURIE et al., 1999; ROSA, 2002), distribuindo-se em quase toda a costa brasileira. Conhecido como slender seahorse ou cavalo



marinho brasileiro, *H. reidi* pode atingir um tamanho máximo de 17,5 cm (LOURIE et al., 2004) ainda que pescadores de peixes ornamentais do Espírito Santos afirmam que animais maiores que 20 cm não são difíceis de serem encontrados no litoral capixaba.

Os cavalos marinhos são comercializados tanto vivos quanto mortos (secos). Os animais vivos atendem à indústria de peixes ornamentais (aquariofilia). Os indivíduos secos, que constituem a maior parte dos cavalos marinhos comercializados no mundo, têm como destino a medicina tradicional, principalmente chinesa, ou, em menor grau, são usados como souvenirs e artesanatos. Para sustentar tais atividades mais de 25 milhões de indivíduos são retirados anualmente da natureza, o que tem contribuído para o declínio das populações selvagens observado no mundo inteiro (VINCENT, 1996). Assim, no Brasil, Rosa et al. (2007) relatam uma baixa densidade populacional de *H. reidi* em várias localidades e, no estado do Ceará, o tamanho médio dos indivíduos adultos é menor que em outros estados devido à pressão de captura sobre os maiores animais.

De 1998 a 2002, o Brasil ficou entre os maiores exportadores de cavalos marinhos do mundo (WABNITZ et al., 2003). Essas exportações eram principalmente sustentadas por *H. reidi*, o qual é uma das espécies mais procuradas para o mercado de aquariofilia mundial e igualmente para a medicina popular e finalidades religiosas (ROSA et al., 2002, 2005).

## CAPÍTULO 1

Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish,  
*Rhamdia quelen*

(artigo publicado na revista Aquaculture)

[doi:10.1016/j.aquaculture.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014)

## CAPÍTULO 1

### Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*

Mauro Alves da Cunha<sup>1</sup>, Francisco Maikon Corrêa de Barros<sup>2</sup>, Luciano de Oliveira Garcia<sup>1</sup>, Ana Paula de Lima Veeck<sup>3</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>2</sup>, Vania Lucia Loro<sup>4</sup>,  
Tatiana Emanuelli<sup>3</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, <sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial ,  
<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, <sup>4</sup>Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

\* Corresponding author

Bernardo Baldisserotto

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: [bernardo@smail.ufsm.br](mailto:bernardo@smail.ufsm.br)

Phone: 55 55 3220-9382 Fax: 55 55 3220-8241

## Abstract

The aims of this study were to identify the times of anesthetic induction and recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*) that were exposed to the essential oil of *Lippia alba*. The efficacy of this oil as an anesthetic and stress-reducing agent and a sensory analysis of fillets prepared from fish exposed to this oil were also performed. Juveniles were placed in aquaria containing different concentrations of oil (5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, or 500 mg L<sup>-1</sup>). Plasma cortisol levels were determined in juveniles anesthetized with the lower concentration of the essential oil of *L. alba* to obtain anesthesia within around 4 min (300 mg L<sup>-1</sup>) and in control fish, both exposed to the air for 1 min. The essential oil of *L. alba* could be used at concentrations ranging from 100 - 500 mg L<sup>-1</sup> to induce anesthesia (stage 4) in silver catfish. The time required for recovery was shorter when lower concentrations of the oil were used. The essential oil of *L. alba* inhibited the increase in plasma cortisol levels that was provoked by handling, and the sensory analysis test demonstrated that this oil did not modify the odor or the taste of the fillet.

Key Words: *Rhamdia quelen*; anesthesia; cortisol; sensory analysis; stress.

## 1. Introduction

Anesthetics are known to be effective at reducing or minimizing stress in fish. The choice of anesthetic generally depends on several factors, including availability, cost, ease of use, physical state and safety to the user (Cho and Heath, 2000). Several substances and combinations of substances, such as alcohol, ether, barbiturates, quinaldine, tricaine methanesulfonate (MS 222), chlorbutanol, and benzocaine have been used to induce anesthesia in fish. However, each of these agents have been associated with undesirable systemic side effects and limited safety margins to the extent that their use has either been limited or rejected altogether (Gilderhus and Marking, 1987; Palić et al., 2006). More recent studies found that less toxic anesthetics, such as clove oil, did not leave toxic residues in fish fillets (Sladky et al., 2001; Soto and Burhanuddin 1995). A further example of a less toxic agent is AQUI-S™; this fish anesthetic/sedative contains isoeugenol, a substance that is also used as an active ingredient in food flavoring (Meinertz et al., 2006). In addition, menthol has been recommended as an adequate anesthetic for the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Façanha and Gomes, 2005).

The genus *Lippia* (Verbenaceae) includes approximately 200 species of small shrubs. These species are mainly distributed throughout Central and South America and tropical Africa (Terblanche and Kornelius, 1996). Some *Lippia* species exhibit sedative actions, and either the essential oil or the phenolic compounds (flavonoids) from these plant extracts are generally assumed to be the active substances (Pascual et al., 2001). *Lippia alba* has been used as a sedative in popular medicine, and certain constituents of the essential oil from this species (citral, myrcene, linalool, and limonene) produce anxiolytic, sedative, and motor relaxant effects in mice (Vale

et al., 1999; 2002; Zétola et al., 2002). The aim of this study was to determine the optimal *L. alba* concentration for the induction of anesthesia in silver catfish and to evaluate the time required for both induction and recovery from anesthesia. In addition, we examined the effect of *L. alba* on plasma cortisol levels in silver catfish that were exposed to handling stress, and assessed the sensory characteristics of the resulting fillets.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Animals*

Juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) were purchased from Bela Vista Fish Culture (Santa Maria, RS, Brazil) and transported to the Laboratory of Fish Physiology at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), where they were housed for two weeks in continuously aerated 250 L tanks, stocking density 1 fish L<sup>-1</sup>, (21 ± 1 °C, pH 6.5 – 7.0, dissolved oxygen levels 6.1 – 7.5 mg L<sup>-1</sup>). A semi-static system was used and 10% of the water volume was changed daily. The fish were given a diet of commercial feed (Vicente Alimentos S.A. Presidente Prudente/SP, Brazil) with 3.5% Ca<sup>2+</sup>, 28.0% crude protein and 3,500 kcal kg<sup>-1</sup> digestible energy, according to the manufacturer. Juveniles were fed once a day, at 8:00 a.m. at a ratio of 5.0% body mass. Juveniles were fasted for a period of 24 h prior to the experiments.

### *2.2 Plant material*

*L. alba* (Mill.) N. E. Brown was cultivated in São Luiz Gonzaga, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The aerial parts of the plant were collected in January 2006. The plant material was identified by the botanist Dr. Gilberto Dolejal Zanetti,

Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, and a voucher specimen (SMDB No. 10050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM.

### *2.3 Essential oil extraction*

Essential oil was obtained from the fresh leaves of the plant by steam distillation for 2 h using a Clevenger type apparatus. In this method, the distillate is collected in a graduated glass tube and the aqueous phase is automatically reused into the distillation flask (European Pharmacopoeia, 2007). The essential oil samples were stored at -20°C in amber glass bottles.

### *2.4 Anesthesia induction and recovery*

Juvenile fish ( $6.56 \pm 2.38$  g and  $7.3 \pm 1.21$  cm) were transferred to aquaria that contained 1 L of water and the essential oil of *L. alba* at concentrations of 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, or 500 mg L<sup>-1</sup>, first diluted in ethanol (1:10). Control experiments were performed using aquaria that contained only ethanol at the concentration that was equivalent to the dilution used for 500 mg L<sup>-1</sup> essential oil. To evaluate the time required for anesthesia induction, 20 juveniles were used for each concentration tested, and each juvenile was used only once, according to the method of Schoettger and Julin (1967). The maximum observation time was 30 min, except those exposed to lower concentrations of the oil (5, 10, and 20 mg L<sup>-1</sup>), which were observed for a period of 6 h. After induction, the juveniles were transferred to anesthetic-free aquaria to measure the anesthesia recovery time.

### *2.5 Measurements of plasma cortisol*

Juvenile fish ( $109.57 \pm 54.56$  g and  $21.52 \pm 4.15$  cm) were anesthetized with  $300 \text{ mg L}^{-1}$  of the essential oil of *L. alba* first diluted in ethanol (1:10) (the lower concentration to obtain anesthesia within around 4 min, see results) in an aquarium that contained 5 L of water (2-4 min). After anesthesia, fish were handled for biometric measurements, which provided an exposure to air for 1 min. Following biometry, blood was collected from the caudal vein of eight juveniles (time 0). The remaining anesthetized juveniles were placed in two 250 L tanks and blood samples of eight fish from one tank were collected 1 h later and from eight fish from another tank 4 h after anesthesia. The lack of exposure to the essential oil notwithstanding, the control group was subjected to the same procedures as the test group, and the fish were held tightly while the biometric measurements were made. Blood was collected using a Hamilton syringe, transferred to 2 mL plastic tubes and centrifuged  $3000 \times g$  to separate the plasma; it was then kept under constant refrigeration. Plasma cortisol levels were measured using a commercially available immunoluminometry kit (Immulite 2000) (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA, USA). The specificity of the test was evaluated by comparing the parallelism between the standard curve and serial dilutions in PBS (pH 7.4) of the plasma samples. No differences were observed between the human and fish samples. The standard curve, which was constructed with human samples, ran parallel to that which was obtained using serial dilutions of silver catfish plasma. A high positive correlation ( $r^2 = 0.9725$ ) between the curves was obtained. The coefficient of variation for the fish ranged from 9 to 12%, and the detection limit of the assay was  $4 \text{ ng mL}^{-1}$ . Fish from which blood was collected at time 0 were euthanized immediately after blood collection by severing the spinal cord. Fillets that were obtained from these fish were subsequently used for sensory analysis.



## 2.6 Sensory analysis

To determine whether there were differences in the taste or odor attributes of fillets prepared from fish that were exposed to 300 mg L<sup>-1</sup> of the essential oil of *L. alba* and those obtained from control fish (no exposure to the essential oil of *L. alba*) (see previous section “Measurement of plasma cortisol”), the standard method as described by Costell (2002) was used. Fillets were cooked in a microwave oven (portions of 20 g for 1 min) and evaluated by 26 untrained judges. The degree of taste and odor difference from the control was measured using a seven-point scale, in which 1 = substantially better than control; 2 = moderately better than control; 3 = slightly better than control; 4 = not different from control; 5 = slightly worse than control; 6 = moderately worse than control; 7 = substantially worse than control. Samples were coded by random numbers and presentation of the samples included a hidden control. Sensory scores were obtained for both the treated samples and the control samples.

## 2.7 Statistical analyses

To verify the homogeneity of variances, all data were submitted to a Levene test. To obtain homogeneity between groups, the plasma cortisol data were submitted to a square root transformation and analyzed using a two-way ANOVA followed by Tukey post hoc tests. The time of anesthetic recovery data were analyzed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. As the variance of the data from each group in the odor sensory analysis test were found to be equivalent, analysis was carried out using Student's t test. As the data from different groups in the taste sensory analysis test showed no homogeneity of variance, they were

analyzed using the Mann-Whitney U test. STATISTICA (version 5.1) was used for analyses, and significance was set at a level of 95% ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results

Fish that were exposed to  $50 \text{ mg L}^{-1}$  essential oil of *L. alba* reached stage 3b, but showed no evidence of being anesthetized (stage 4) during the 30 min evaluation period. The increasing concentration of oil proportionally decreased the time required for sedation and anesthesia induction. As the induction was very rapid, it was not possible to visualize stage 2 in fish that were exposed to concentrations of  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (Table 1). No mortality resulted from anesthesia induction within the range of 100 and  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . The sole application of ethanol did not produce an anesthetic effect. Whether or not the essential oil of *L. alba* was diluted in ethanol had no effect on the anesthesia induction time. The time of recovery was significantly faster following exposure to the lowest concentrations tested ( $50$  and  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Table 1). Silver catfish that were exposed to low concentrations ( $5$ ,  $10$ , and  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) of the oil for 6 h maintained a uniform depth of sedation, i.e., they remained at stages 1 or 2.

Silver catfish from the control group had significantly higher plasma cortisol levels at 1 h and 4 h after biometric measurements than at time 0 h ( $P < 0.05$ ). However, compared to time 0 h, there were no significant increases in plasma cortisol levels at times 1 and 4 h in fish that were anesthetized with the essential oil of *L. alba* ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ). In addition, the plasma cortisol levels of silver catfish that were anesthetized with the essential oil of *L. alba* were significantly lower than those from control group at times 1 h and 4 h (Figure 1).

Fillets that were prepared from silver catfish that had been anesthetized with the essential oil of *L. alba* received sensory scores (mean  $\pm$  standard deviation) for

odor ( $3.74 \pm 0.35$ ) and taste ( $4.40 \pm 0.37$ ) that were similar to those of control fish ( $3.92 \pm 1.34$  and  $4.11 \pm 0.81$ , respectively).

## 4. Discussion

### 4.1 Anesthesia induction and recovery

As Vale et al. (1999, 2002) and Zétola et al. (2002) previously described the sedative and myorelaxant effects of this plant in mice, the anesthetic effects of the essential oil of *L. alba* in silver catfish were not unexpected. In addition, the essential oil of this plant has been shown to increase ketamine-induced sleep in mice (Fauth et al., 2002).

According to the tests with small silver catfish, the concentration of the essential oil of *L. alba* that is required to induce deep anesthesia (stage 4) is  $100 \text{ mg L}^{-1}$  or higher; however, to obtain rapid anesthesia ( $< 4 \text{ min}$ ), concentrations of  $300\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$  must be used. The recovery time of anesthesia induced by this oil was  $4.5\text{-}7.4 \text{ min}$ . Using  $100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$  MS-222, silver catfish can be anesthetized within  $1\text{-}2.4 \text{ min}$  and can recover within  $0.25\text{-}1.45 \text{ min}$ . Although anesthesia of this species with quinaldine is also rapid ( $0.28\text{-}1.9 \text{ min}$  with  $10\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$  and recovery time of  $0.25\text{-}8.75 \text{ min}$ ), it only extends to stage 3b. Benzocaine at  $50\text{-}125 \text{ mg L}^{-1}$  (higher concentrations are not recommended) can induce deep anesthesia in silver catfish within  $1\text{-}2 \text{ min}$ , and recovery time can take  $0.76\text{-}2.4 \text{ min}$  (Seigneur, 1984). The channel catfish, *Ictalurus punctatus*, can reach stage 4 of anesthesia within  $2\text{-}5 \text{ min}$  with  $8 \text{ mg L}^{-1}$  etomidate (Limsuwan et al., 1983),  $4\text{-}8 \text{ mg L}^{-1}$  metomidate (Small, 2003) and  $20\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$  Aqui-S (Stehly and Gingerich, 1999).

The effect of clove oil, which is obtained from the stem, leaves and buds of the *Eugenia caryophyllata* tree, varies according to the species of fish, but 30-50 mg L<sup>-1</sup> induced deep anesthesia within 2-8 min in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Keene et al., 1998), juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Cho and Heath, 2000), black pacu, *Piaractus brachipomus* (Sladky et al., 2001), matrinxã, *Brycon amazonicus* (Inoue et al., 2003), and Atlantic salmon, *Salmo salar* (Iversen et al., 2003). Menthol, the main component of the essential oil of plants from genus *Mentha*, at concentrations of 100-200 mg L<sup>-1</sup> can provoke deep anesthesia in tambaqui after 1-2 min, and result in a recovery time of 5-12 min (Façanha and Gomes, 2005).

#### 4.2 Evaluation of plasma cortisol

One of the main fish responses to adverse situations is the production of catecholamines and corticosteroids; these are responsible for physiological and biochemical changes and are usually characterized as stress responses (Barton and Iwama 1991). The secretion of cortisol is dependent on the severity and the precise nature of the stress that is applied (Sumpter et al., 1985). The resting plasma cortisol level in non-stressed silver catfish is  $23.80 \pm 5.45$  ng mL<sup>-1</sup> (Barcellos et al., 2006); this is similar to the levels that were found in the present study at time 0 h. In addition, the handling procedures and the exposure to air that were necessary components of the biometric measurements led to increases in the plasma cortisol levels in control silver catfish 1-4 h later. A similar plasma cortisol increase 1 h after handling was also observed in 12 g catfish juveniles by Barcellos et al. (2006), but the magnitude of the cortisol stress response was much lower in the present study. This difference in the magnitude of cortisol response might be due to the fact that fish

in the present study were almost 10-fold larger than in the study of Barcellos et al. (2006), or due to a different type of handling.

Anesthesia of silver catfish with the essential oil of *L. alba* prevented these increases in plasma cortisol. Other anesthetics, such as metomidate (2-10 mg L<sup>-1</sup>), clove oil and AQUI-S (20-100 mg L<sup>-1</sup>), have also been shown to prevent elevations in plasma cortisol above resting levels in Atlantic salmon after tank transference (Iversen et al., 2003). Clove oil was also effective at reducing the rise in plasma cortisol levels that resulted from handling in rainbow trout (60 mg L<sup>-1</sup>) (Wagner et al., 2003) and in fathead minnows, *Pimephales promelas* (30 mg L<sup>-1</sup>) (Palić et al., 2006). The rise in cortisol levels after confinement or low water stress in channel catfish could also be prevented with either 2.5 mg L<sup>-1</sup> isoeugenol (Small, 2004) or 25-35 mg L<sup>-1</sup> AQUI-S (50% isoeugenol) (Bosworth et al., 2007). However, some anesthetics do not inhibit elevations in plasma cortisol; these include benzoak (30-100 mg L<sup>-1</sup>) in Atlantic salmon (Iversen et al., 2003), and MS-222 in channel catfish (100 mg L<sup>-1</sup>) (Small, 2003) and fathead minnows (75 mg L<sup>-1</sup>) (Palić et al., 2006).

#### 4.3 Sensory analysis

The use of a concentration of the essential oil of *L. alba* that was sufficiently high (300 mg L<sup>-1</sup>) to induce deep anesthesia in silver catfish within approximately 4 min did not alter the odor or taste of its fillets. The sensory analysis in the present study was relevant because it evaluated fish quality in a similar manner to the consumer. Recent studies have proposed the use of certain methods of anesthesia to minimize possible suffering during slaughter and to maximize the quality of the final product for market sale. In Senegal sole, *Solea senegalensis*, anesthesia with 1 mg L<sup>-1</sup> clove oil (time of exposure not stated) was considered to be a better method

for stunning than either hypothermia (temperature change of 12-14°C) or asphyxiation (air exposure), because it resulted in a higher quality of fillets (Ribas et al., 2007). Post-sedation euthanasia of channel catfish by CO<sub>2</sub> was found to be superior to post-sedation euthanasia using AQUI-S overdose (150 mg L<sup>-1</sup>), nitrogen gas, or electrical stunning; however, the combination of AQUI-S application before harvest followed by CO<sub>2</sub> euthanasia has the potential to improve fillet quality (Bosworth et al., 2007).

In conclusion, the essential oil of *L. alba* is effective at inducing slight sedation in silver catfish at 5-20 mg L<sup>-1</sup> and deep anesthesia at 100–500 mg L<sup>-1</sup>. Furthermore, the use of 300 mg L<sup>-1</sup> of this essential oil inhibits the elevation in cortisol that is a consequence of handling, and did not affect either the odor or the taste of silver catfish fillets. Regarding human safety concerns, the fact that this plant has been widely used as food seasoning (Morton, 1981), may facilitate its approval for use as an anesthetic in fish that are destined for direct human consumption.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). B. Baldisserotto, T. Emanuelli, L.O. Garcia and V.L. Loro received CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) research grants, M.A. Cunha and F. M. C. de Barros received a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) research grants.

**References:**

- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253, 317-321.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 10, 3-26.
- Bosworth, B.G., Small, B.C., Gregory, D., Kim, J., Black, S., Jerrett, A., 2007. Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S (TM) on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. *Aquaculture* 262, 302-318.
- Costell, E., 2002. A comparison of sensory methods in quality control. *Food Quality and Preference* 13, 341-353.
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 31, 537-546.
- Façanha, M.F., Gomes, L.C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica* 35, 71-75.
- European Pharmacopoeia, 2007. 6th ed. Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines.
- Fauth, S., Campos, A. R., Silveira, E.R., Rao, V. S., 2002. Efeitos de óleos essenciais de plantas no tempo de sono induzido por cetamina em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12, 112-113.
- Gilderhus, P.A., Marking, L.L., 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 7, 288–292

- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 211-222.
- Inoue, L.A.K., Santos Neto, C., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural* 33, 943-947.
- Iversen, M., Finstad, B. McKinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221, 549–566.
- Keene, J.L., Noakes, D.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29, 89–01.
- Limsuwan, C., Grizzle, J.M., Plumb, J.A., 1983. Etomidate as an anesthetic for fish - its toxicity and efficacy. *Transactions of American Fisheries Society* 112, 544-550.
- Meinertz, J. R., Greseth, S.L., Schreier, T.M., Bernardy, J.A., Gingerich, W.H., 2006. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S™ at different temperatures, durations, and concentrations. *Aquaculture* 254, 347-354.
- Morton, 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*, vol. I. Springfield, Illinois, USA.
- Palić, D., Herolt D.M., Andreasen C.B, Menzel B.W., Roth J.A., 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* 254, 675–685.



- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76, 201-214.
- Ribas, L., Flos, R., Reig, L., MacKenzei, S., Barton, B.A., Tort, L., 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture* 269, 250-258.
- Schoettger, R.A., Julin, M., 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Invest. Fish Contr., U.S. Dept. Int.* 13, 1 –15.
- Seigneur, G.N., 1984. Eficiencia del Ms-222, quinaldina y benzocaina como anestésicos en *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840). *Memorias Del Asociación Latinoamericana de Acuicultura* 5, 633-639.
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). *American Journal of Veterinary Research* 62, 337–342.
- Small, B.C., 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218, 177-185.
- Small, B.C., 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture* 238, 469-481.
- Soto, C.G., Burhanuddin, G., 1995. Clove oil as a fish anesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 135, 149–152.

- Stehly, G.R., Gingerich, W.H., 1999. Evaluation of Aqui-Sk (efficacy and minimum toxic concentration) as an anesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture Research* 30, 365–372.
- Sumpter, J.P., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1985. Stress-induced elevation on plasma  $\alpha$ -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* 59, 257–265.
- Terblanche, F.C., Kornelius, G., 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. *Journal of Essential Oil Research* 8, 471–485.
- Vale, T. G., Matos, F. J. A., Lima, T. C. M., Viana, G. S. B., 1999. Behavioral effects of essential oil from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Journal of Ethnopharmacology* 167, 127-33.
- Vale, T. G., Furtado, E. C., Santos JR., J. G., Viana, G. S. B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Phytomedicine* 9, 709-14.
- Wagner, G.N., Singer, T.D., McKinley, R.S., 2003. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* 34, 1139-1146.
- Zétola, M., Lima, T. C. M., Sonaglio, D., González-Ortega, G., Limberger, R. L., Petrovick, P. R., Bassani, V. L., 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melisse). *Journal of Ethnopharmacology* 82, 207-215.

Table 1 – Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of *Lippia alba* in silver catfish juveniles. Stages according to Schoettger and Julin (1967). Maximum observation time was 30 min. Time to reach each stage in seconds (s). N = 20 for each concentration tested.

Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Induction				time of recovery (s)
	stage 2 (s)	stage 3a (s)	stage 3b (s)	stage 4 (s)	
5	*	-	-	-	-
10	1654.1±48.0	-	-	-	-
20	1293±72.0	-	-	-	-
50	646.2±266.6	1045.5±105.2	1468.7±130.0	-	231.7±7.6 <sup>a</sup>
100	296.0±17.7	441.2±118.4	596.9±163.6	976.7±139.9	276.2±52.2 <sup>a</sup>
200	186.1±27.1	238.9±33.2	308.6±33.1	428.1±107.8	435.5±156.0 <sup>b</sup>
300	103.1±26.5	159.4±25.4	195.0±29.0	232.0±26.6	385.3±188.8 <sup>b</sup>
400	50.0±9.2	72.5±11.4	127.4±20.3	150.0±23.0	443.6±143.4 <sup>b</sup>
500	-	36.7±5.8	60.2±7.3	75.0±6.5	349.7±54.9 <sup>b</sup>
equations	$\text{Lny} = -274.2 + 6424.3/x^{0.5}$ $r^2 = 0.992$	$\text{Lny} = 8.33 - 0.20x^{0.5}$ $r^2 = 0.980$	$\text{Lny} = 8.50 - 0.19x^{0.5}$ $r^2 = 0.980$	$\text{Lny} = 8.92 - 0.20x^{0.5}$ $r^2 = 0.990$	-

where y = time to reach the stage and x = concentration of the essential oil of *Lippia alba* (mg L<sup>-1</sup>)

\* Fish reached this stage after 43 min (2617.5 ± 208.31 s)

## Figure Legends

Figure 1 – Effect of the essential oil of *Lippia alba* (300 mg L<sup>-1</sup>) on plasma cortisol levels in silver catfish that were exposed to air for 1 min. N = 8.

\* significantly different from control at the same time (P < 0.05)

+ significantly different from time 0 h (P < 0.05) using two-way ANOVA and Tukey test.

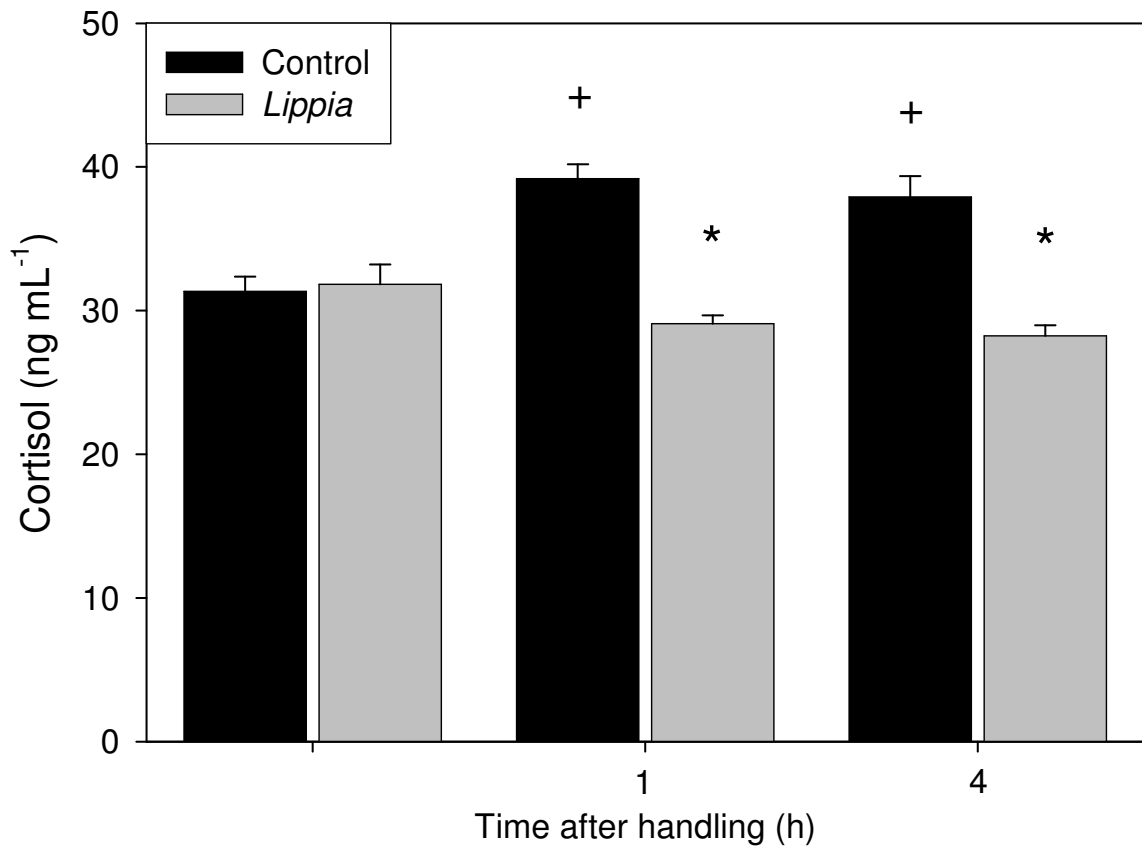


Figure 1



## **CAPÍTULO 2**

**Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi*  
exposed to the essential oil of *Lippia alba***

## CAPÍTULO 2

### **Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba***

Mauro Alves da Cunha<sup>1</sup>, Bruno Ferreira da Silva<sup>3</sup>, Frederico Augusto Cariello Delunardo<sup>3</sup>, Simone Cristina Benovit<sup>2</sup>, Levy de Carvalho Gomes<sup>3</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>2</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, <sup>2</sup> Departamento de Farmácia Industrial Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Universidade de Vila Velha, Vila Velha – ES,

\* Corresponding author

Bernardo Baldisserotto

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 – Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: bbaldisserotto@hotmail.com

Phone: 55 55 3220-9382 fax: 55 55 3220-8241



## Abstract

The aim of this study was to identify the times of anesthetic induction and recovery in slender seahorses (*Hippocampus reidi*) that were exposed to the essential oil of *Lippia alba* (EO), as well as the efficacy of EO as a stress-reducing agent in the transport of this species. Slender seahorses were placed in 1-L aquaria containing different concentrations of EO (0, 10, 20, 50, 150, 300 and 450  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), and after induction, fish were transferred to aquaria that were free of anesthetic to evaluate their recovery time. In an additional experiment, slender seahorses were transported in plastic bags with 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  of EO for 4 or 24 h. The increased concentration of EO proportionally decreased the time required for the induction of anesthesia. EO treatment (15  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) inhibited the increase in blood glucose levels that was provoked by transportation for 4 or 24 h. Transportation for 24 h also decreased the number of lymphocytes and increased the neutrophil count, and these effects were avoided with the addition of EO to the water. These results demonstrate that EO was effective as an anesthetic at concentrations of 10-20  $\mu\text{L L}^{-1}$  for slight sedation and transport and at 150  $\mu\text{L L}^{-1}$  for deep anesthesia in the slender seahorse.

Keywords: Seahorse, blood glucose, leukocyte count, stress

## Resumo

O objetivo deste estudo foi identificar os tempos da indução e recuperação anestésica em cavalos marinhos (*Hippocampus reidi*) expostos ao óleo essencial de *Lippia alba* (OE), assim como a eficácia do OE como um agente redutor de estresse no transporte desta espécie. Os cavalos marinhos foram colocados em aquários contendo 1 litro de água e diferentes concentrações de OE (0, 10, 20, 50, 150, 300 e

450  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), após a indução, os peixes foram transferidos à aquários livre de anestésico para avaliar o tempo de recuperação. Em um outro experimento os cavalos marinhos foram transportados em sacos plásticos contendo 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  do OE por 4 ou 24h. A concentração crescente do OE diminuiu proporcionalmente o tempo exigido para a indução da anestesia. O óleo essencial (15  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) inibiu o aumento nos níveis de glicose sanguínea provocada pelo transporte por 4 ou 24 h. O transporte por 24 h igualmente diminuiu o número de linfócitos e aumentou o número de neutrófilos, estas alterações foram evitadas com o uso do OE na água. Estes resultados demonstram que no cavalo marinho o OE é eficaz para a sedação e transporte na faixa de 10-20  $\mu\text{L L}^{-1}$  e para a anestesia profunda recomenda-se 150  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

Palavras chave: Cavalo marinho, glicose sanguínea, contagem de leucócitos, estresse

## 1. Introduction.

The slender seahorse, *Hippocampus reidi*, is one of the most exported Brazilian marine ornamental fish species (Monteiro-Neto *et al.*, 2003). This species is also collected for folk medicine, souvenirs and religious purposes (Rosa *et al.*, 2002, 2005). The seahorses produced in Brazil are usually exported to the United States. Mortality generally occurs either during transport or within weeks of arrival at the destination as a delayed physiological stress response to collection, handling and transport. Stress-related damage is most likely to be highest between collection and export, as the conditions for holding and transport are poorest at this level (Koldewey *et al.*, 2005). Severe or chronic stress is often associated with poor performance and has long been suspected to cause immunosuppression in cultured fish (Pickering, 1998). Stress may induce the release of epinephrine and norepinephrine by chromaffin tissue in response to stimulation of the sympathetic nervous system, which might increase plasma glucose levels (Gomes *et al.*, 2006), neoglucogenesis, the deposition of glycogen in the liver, immunosuppression and leukocyte counts (Ross & Ross, 2008). Similarly, Ellsaesser & Clem (1987) showed that both the number and immunological competence of circulating lymphocytes in the blood of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) were reduced following chronic stress.

Anesthetics are known to be effective at reducing or minimizing stress in fish. Certain anesthetics have been used in the transport of fish, such as benzocaine in *Menidia estor* (Ross *et al.*, 2007) and amylobarbitone, barbital sodium, chloral hydrate, MS222, quinaldine, tertiary amyl alcohol and urethane in Indian carp (Das & Goswami 2003). The essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (EO) is effective as an anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Cunha *et al.*, 2010), but no studies on EO have been performed in other species or on its effects on fish during

transport. Therefore, the aim of this study was to identify the anesthetic induction and recovery times in slender seahorses that were exposed to EO, as well as the efficacy of EO as a stress-reducing agent in the transport of this species. This is also the first study dealing with seahorse transport.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Animals*

Juvenile slender seahorses were acquired from a local producer in the city of Serra - ES, Brazil. They were transported to the laboratory and kept in continuously aerated 100-L aquaria with controlled temperature (22.3°C), salinity  $27.5 \pm 0.2$  and dissolved oxygen levels  $5.5 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ . A voucher specimen was registered in the ichthyologic collection at the Universidade Federal do Espírito Santo (CI-UFES 1027).

### *2.2 Plant material*

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown was cultivated at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) campus, Santa Maria, RS, Brazil. Samples of the aerial portions of the plant were collected in October, 2008. The plant material was identified by Dr. Gilberto Dolejal Zanetti from the Departamento de Farmácia Industrial, UFSM. A voucher specimen (SMDB No. 10050) was deposited in the herbarium of the Departamento de Biologia, UFSM.

### *2.3 Essential oil extraction*

The essential oil was obtained from fresh leaves of the plant by hydrodistillation, using a Clevenger type apparatus for 2 h (European Pharmacopoeia, 2007). Essential oil samples were stored at -20 °C in amber glass bottles.

#### *2.4 Anesthesia induction and recovery*

Slender seahorse juveniles ( $2.5 \pm 0.5$  g and  $10.0 \pm 1.0$  cm) that had been fasted for 24 hours were transferred to aquaria containing 1 L of water and EO at concentrations of 10, 20, 50, 150, 300 and 450  $\mu\text{L L}^{-1}$  (equivalent to 8, 16, 40, 120, 240 and 360  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively, because the density of this EO is approximately 0.80), with the EO first being diluted in ethanol (1:10). Control experiments were performed using aquaria that contained only ethanol at a concentration equivalent to the dilution used for the 450  $\mu\text{L L}^{-1}$  EO treatment. To evaluate the time required for anesthesia induction, 10 seahorses, each of which were placed in individual aquaria, were used for each concentration tested, and each juvenile was used only once, according to the method of Schoettger & Julin (1967). The maximum observation time was 45 min, except in the seahorses exposed to the lower concentrations of EO (10 and 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), which were observed for a period of 6 h to determine the concentration to be used for transport. After induction, the juveniles were transferred to anesthetic-free aquaria to measure the anesthesia recovery time.

#### *2.5 Transport*

Slender seahorses ( $2.3 \pm 0.8$  g and  $9.8 \pm 1.1$  cm) were placed in plastic bags (one seahorse per bag) containing 0.5 L of water with 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  of EO that had previously been diluted in ethanol (1:10) ( $n=10$  for treatment) and transported for 4 or

24 h. This concentration was used because there was no significant difference observed between the 10 and 20  $\mu\text{L L}^{-1}$  treatments with respect to the anesthetic stage reached. The control group was subjected to the same procedures but no anesthetic was added to the water. Bags were then inflated with oxygen, tied with rubber strings and packed in plastic boxes, as described by Gomes *et al.* (2006). Water samples were collected before the plastic bags were closed and after transport for determination of dissolved oxygen, temperature and salinity with an oxygen meter YSI (model Y5512 Yellow Springs, USA). Blood samples ( $n= 10$  for each treatment) were collected at the end of the transport period and from a group that was not subjected to transportation. An aliquot of the blood was used for glucose determination with a digital Accu-Check™ apparatus, and another aliquot was smeared on clean slides (two per fish), which were dried at room temperature for 24 h, and then fixed in 100% methanol for 10 min. Subsequently, they were stained with 4% Giemsa solution for 10 min, air-dried, and then prepared for counting lymphocytes, eosinophils, neutrophils, thrombocytes, monocytes, and basophiles; one hundred random leukocytes cells had been counted for each individual with the aid of a Leica Galen III optical microscope, as described by Tavares-Dias *et al.* (2000).

## 2.6 Statistical analyses

To verify the homogeneity of variances, all data were submitted to a Levene test. As data were homocedastics, they were analyzed using two-way ANOVA and Tukey tests. STATISTICA (version 5.1) was used for analyses, and significance was set at a level of 95% ( $P < 0.05$ ).

### 3. Results

An increasing concentration of EO proportionally decreased the time required for anesthesia induction. Slender seahorses that were exposed to low concentrations (10 and 20  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) of the EO for 6 h maintained a uniform state of sedation, i.e., they remained at stage 2 (Table 1). No mortality resulted from anesthesia induction within the range tested. The application of ethanol alone did not produce an anesthetic effect. No significant difference was found in the recovery time at the different concentrations of the EO tested.

There was no significant difference in the dissolved oxygen levels ( $16.60 \pm 4.20$  mg  $\text{L}^{-1}$ ), salinity ( $27.6 \pm 0.2$ ) or temperature ( $22.8 \pm 0.6$  °C) after transportation, and no mortality was observed in any of the treatments. The lymphocyte and neutrophil counts of the control slender seahorses transported for 24 h presented significantly lower and higher values, respectively, than before transport. No significant change was observed in eosinophil, thrombocyte, monocyte, basophile counts (Table 2).

The blood glucose levels of control slender seahorses increased significantly after 4 and 24 h of transportation compared to before transport. Fish transported under conditions of 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  EO did not exhibit any significant change in their blood glucose levels compared to before transport (Fig. 1).

### 4. Discussion

#### 4.1 Anesthesia induction and recovery

The maximum allowable time for the induction of deep anesthesia (stage 4) in fish is 10 min (Roubach *et al.*, 2005; Ross & Ross, 2008). The lowest concentration of the EO used here that was capable of inducing deep anesthesia in the slender seahorse was 50  $\mu\text{L L}^{-1}$ , but 150 - 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  was required to obtain rapid

(approximately 3 - 4 min) deep anesthesia (Table 1). In the silver catfish, the lowest concentration of EO that is able to induce deep anesthesia is  $100 \mu\text{L L}^{-1}$ , while rapid anesthesia is reached with concentrations of  $300\text{-}500 \mu\text{L L}^{-1}$ , and recovery time is  $350\text{-}450 \text{ s}$  (Cunha *et al.*, 2010). Apparently, the slender seahorse is more easily anesthetized by EO than the silver catfish, but the time of recovery was similar in both species. Recovery time is usually faster at lower concentrations of anesthetic, and it becomes more prolonged as the concentration increases (Ross & Ross, 2008). However, the different concentrations of EO tested in the slender seahorse did not affect recovery time.

No other studies besides Cunha *et al.* (2010) have been reported on anaesthetizing fish using EO, but menthol at concentrations of  $100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$  can provoke deep anesthesia in the tambaqui, *Colossoma macropomum*, after 1-2 min, and this results in a recovery time of 5-12 min (Façanha & Gomes, 2005), similar to what was found in the present study for slender seahorses. Deep anesthesia can be achieved in the tropical reef fishes Sergeant Major *Abudefduf saxatilis*, Cocoa damselfish *Stegastes variabilis*, Maria-nagô *Pareques acuminatus*, Doctorfish *Acanthurus chirurgus*, Budião-batata *Sparisoma axillare*, Schoolmaster snapper *Lutjanus apodus*, and Frillfin goby *Bathygobius soporator* with  $20 \text{ mg L}^{-1}$  clove oil, with associated induction and recovery times of less than 3 and 5 min, respectively (Cunha & Rosa, 2006).

#### 4.2 Transport

Sedation can be beneficial in fish transportation, especially in cases where long distances are to be covered, but there may also be advantages of sedating animals for short journeys. Stage two of anesthesia, or deep sedation, which was



characterized by Schoettger and Julin (1967) as “partial loss of equilibrium, no reaction to external stimuli”, is considered an ideal condition for transporting fish because fish sedated at this level exhibit reduced activity but are able to maintain partial equilibrium, swimming capacity, and avoid physical damage resulting from collision with plastic bags (Cooke *et al.*, 2004).

Stress can increase blood glucose levels (Biron & Benfey, 1994; Wendelaar-Bonga, 1997; Barcellos *et al.*, 2003) and affect leukocyte levels (Sopinska, 1984; Dick & Dixon, 1985, Ellsaesser & Clem, 1986; Pickering & Pottinger, 1987). The blood glucose level of the control slender seahorses increased after transport, which is in agreement with previous findings in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Barton *et al.*, 1986), coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Vijayan & Leatherland, 1989), brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Biron & Benfey, 1994) and pirarucu, *Arapaima gigas* (Brandão *et al.*, 2006), following transportation. Slender seahorses transported with EO did not exhibit this increase in blood glucose levels, indicating a lower stress level throughout transportation. Similarly, clove oil (5 mg L<sup>-1</sup>) can mitigate the stress response in the matrinxã, *Brycon amazonicus*, subjected to transport, as it prevents increases of plasma glucose, cortisol, lactate, ammonia, Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> (Inoue *et al.*, 2005). Furthermore, benzocaine (0 or 20 mg L<sup>-1</sup>) and clove oil (0, 2, or 5 mg L<sup>-1</sup>) can be used as anesthetics for transport based on the observation that the survival of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, was satisfactory (general average of 97.26%) after 5 h of transport (Oliveira, 2009). Largemouth bass, *Micropterus salmoides*, transported using 5-9 mg L<sup>-1</sup> of clove oil presented a loss of reactivity and reduced cardiac output while maintaining equilibrium and recovering more rapidly than non-anesthetized controls (Cooke *et al.*, 2004).

The number of leukocytes present in an organism changes in situations of stress, depending on the studied species. An increase in the number of leukocytes was found in tambaqui (Tavares-Dias *et al.*, 2001) and in the hybrid tambacu *C. macropomum* x *Piaractus mesopotamicus* (Martins *et al.*, 2002) after being subjected to handling. The number of thrombocytes decreased in pacu, *P. mesopotamicus* (Martins *et al.*, 2000), and did not change in tambacu (Martins *et al.*, 2002) subjected to handling. Transportation of slender seahorses for 24 h decreased their lymphocyte and increased their neutrophil counts. A reduction in the concentration of lymphocytes and an increase in the number of neutrophils was also observed in the common carp, *Cyprinus carpio*, and the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, after being subjected to the stress of capture or transport (Sopinska, 1984; Ellsaesser & Clem, 1986), as well as in Nile tilapia following the stress of capture (Martins *et al.*, 2004), the European eel, *Anguilla anguilla*, under the stress of handling (Johansson-Sjöbeck *et al.*, 1978) and the common dab, *Limanda limanda*, after being subjected to acute stress (Pulsford *et al.*, 1994).

Stress is associated with cortisol release in the blood following the activation of the hypothalamic–pituitary–inter-renal (HPI) axis. This hormone binds to receptors in leukocytes, leading to immunosuppression in most situations. One of the well-known effects of cortisol is the regulation of leukocyte migration in tissues. Stress increases the number of neutrophils (leukocytes involved in the inflammatory response) and reduces the counts of lymphocytes (leukocytes involved in the immune response) (Bauer *et al.*, 2001). It is noteworthy that these changes are due to cortisol and norepinephrine, which induce leukocyte migration from blood to tissues and vice-versa (Pulsford *et al.*, 1994).

In conclusion, EO is effective in inducing slight sedation in the slender seahorse at concentrations of 10-20  $\mu\text{L L}^{-1}$  and deep anesthesia at concentrations of 50–450  $\mu\text{L L}^{-1}$ , and for rapid deep anesthesia, a concentration of 150  $\mu\text{L L}^{-1}$  is recommended. Furthermore, adding 15  $\mu\text{L L}^{-1}$  of EO to the water in which seahorses are transported inhibits the elevation of blood glucose and neutrophils and decrease in lymphocytes that occur without this anesthetic in the slender seahorse, and therefore, its use in the transport of this species is suggested because apparently reduces the stress of transport.

### **Acknowledgements**

This work 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 and L.C. Gomes received a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) research fellowship, and M.A. Cunha received a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) PhD fellowship. Authors also thank Dr. Gilberto Dolejal Zanetti from the Departamento de Farmácia Industrial, UFSM for identification of the plant species.

### **Literature cited**

Barcellos, L. J. G., L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, I. Fioreza, L. B. Rodrigues, A. B. Soso, F. Ritter, J. Conrad, L. Cericato, M. Fagundes & S. R. Terra. 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen*

- Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, 34: 1465-1469.
- Barton, B. A., C. B. Schreck & L. A. Sigismondi. 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 245-251.
- Bauer, M. E., P. Perks, S. L. Lightman & N. Shanks. 2001. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiology & Behavior*, 73: 525-532.
- Biron, M. & T. J. Benfey. 1994. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis Mitchill*). *Fish physiology and biochemistry*, 13(2): 153-160.
- Brandão, F. R., L. C. Gomes & E. C. Chagas. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36(3): 349 – 356.
- Cooke, S. J., C. D. Suski, K. G. Ostrand, B. L. Tuft & D.H. Wahl. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 239: 509-529.
- Cunha, F. E. A. & I. L. Rosa. 2006. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. *Journal of Fish Biology*, 69: 1504–1512.
- Cunha, M. A., F. M. C. Barros, L. O. Garcia, A. P. L. Veeck, B. M. Heinzmannh, V. L. Loro, T. Emanuelli & B. Baldisserotto. 2010. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306: 403-406.

- Das, S. K. & U. C. Goswami. 2003. Evaluation of a few locally available anaesthetics for potential use in fish seed transportation, *Fishery Technology*. Society of Fisheries Technologists, 40: 101–104.
- Dick, P. T. & D. G. Dixon. 1985. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology*, 26: 475-481.
- Ellsaesser, C. F. & L. W. Clem. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology*, 28: 511-521.
- Ellsaesser, C.F. & L.W Clem. 1987. Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 87: 405–408.
- European Pharmacopoeia. 2007. Strassbourg, European Directorate for the Quality of Medicines 6th ed.
- Façanha, M. F. & L. C. Gomes. 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica*, 35: 71–75.
- Gomes, L. C., B. Baldisserotto, E. C. Chagas, R. Roubach, R. P. Brinn & C. E Coppati. 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture*, 256: 521-528.
- Inoue, L. A. K. A., L. O. B. Afonso, G. K. Iwama & M. G. Gilberto. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, 35(2): 289 – 295.

- Johansson-Sjoberg, M., G. Dave, A. Larsson, K. Lewander & U. Lidman. 1978. Hematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla Anguilla L.* *Comparative Physiology and Biochemistry*, 60: 165-168.
- Koldewey, H., C. Delbeek, A. Marshall & C. E. Keen. 2005. Collection and Transportation of Seahorses, In: *Syngnathid Husbandry in Public Aquariums. Manual*, 137.
- Martins, M. L., F. R. Moraes, J. R. E. Moraes & E. B. Malheiros. 2000. Falha na resposta do cortisol estresse por captura por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, 22(2): 545-552.
- Martins, M. L., F. R. Moraes, R. Y. Fujimoto, D. T. Nomura & J. Fenerick. 2002. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. *Boletim do Instituto de Pesca*, 28(2):195-204.
- Martins, M.L., F. Pilarsky, E. M. Onaka, D. T. Nomura, J. Fenerick Jr., K. Ribeiro, D. M. Y. Myiazaki, M. P. Castro & E. B. Malheiros. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim do Instituto de Pesca*, 30: 71-80.
- Monteiro-Neto, C., F. E. A. Cunha, M. C. Nottingham, M. E. Araujo, I. L. Rosa & G. M. L. Barros. 2003. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, Northeast Brazil. *Biodiversity Conservation*, 12(6): 1287-1295.
- Oliveira, J. R., J. L. Carmo, K. K. C. Oliveira & M. C. F. Soares. 2009. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(7): 1163-1169.

- Pickering, A.D. 1998. Stress responses of farmed fish. In: Black, K. D., Pickering, A.D. (Eds.), *Biology of Farmed Fish*. Sheffield Academic Press, Sheffield, Pp. 222–243.
- Pickering, A. D. & T. G. Pottinger 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *Journal of Fish Biology*, 30: 701-712.
- Pulsford, A. L., S. Lemaire-Gony, M. Tomlinson, N. Collingwood & P. J. Glynn. 1994. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109(2): 129-139.
- Ross, L. G., J. S. Blanco, C. Martínez-Palacios, I. S. Racotta & M. T. Cuevas. 2007. Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia, *Aquaculture Research*, 38: 909-917.
- Ross, L. G. & B. Ross. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p.
- Rosa, I. L., T. L. Dias & J. K. Baum. 2002. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). *Environmental Biology of Fishes*, 64(4): 378.
- Rosa I. M. L., R. R. N. Alves, K. M. Bonifácio, J. S. Mourão, F. M Osório, T. P. R. Oliveira & M. C. Nottingham. 2005. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1(12).
- Roubach, R., L. C. Gomes, F. A. L. Fonseca & A. L. Val. 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11): 1056 –1061.
- Schoettger, R. A. & M. Julin. 1967. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Investigations in Fish Control*, U.S. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Resource Publication 13: 1–15.

- Sopinska, A. 1984. Effect of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. II. Hematological results of stress in carp. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 14(1-2): 121-139.
- Tavares-Dias, M., S. H. C. Schalch, E. D. Silva, M. L. Martins & F. R. Moraes. 2000. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivada intensivamente em pesque-pague do município de Franca, SP, Brasil. *Arquivos de Veterinária*, 16: 76-82.
- Tavares-Dias, M., E. F. S. Sandrim, F. R. Moraes & P. C. F. Carneiro. 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(1): 43-48.
- Vijayan, M. M. & J. F. Leatherland. 1989. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, 7: 2746-2750.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77(3): 591-625.



**Table 1.** Time required for induction and recovery from anesthesia using the essential oil of *Lippia alba* in slender seahorse juveniles. Stages according to Schoettger & Julin (1967). Maximum observation time was 45 min. The time to reach each stage in seconds (s) is shown. N = 10 for each concentration tested. No relationship between concentrations of the essential oil of *L. alba* and time of recovery was found.

Concentration ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	Induction				Time of recovery
	Stage 2	Stage 3a	Stage 3b	Stage 4	
10	2280 $\pm$ 290.9	-	-	-	-
20	1868 $\pm$ 300.2	-	-	-	-
50	1011.4 $\pm$ 250.3	1433.5 $\pm$ 98.2	1564.4 $\pm$ 305.3	1771.4 $\pm$ 256.3	273.5 $\pm$ 43.5
150	76.1 $\pm$ 81.6	221.2 $\pm$ 78.4	228.1 $\pm$ 54.2	241.1 $\pm$ 58.7	337.5 $\pm$ 63.2
300	40.9 $\pm$ 33.2	135.9 $\pm$ 23.2	185.6 $\pm$ 60.5	190.3 $\pm$ 41.2	319.4 $\pm$ 70.5
450	10.9 $\pm$ 35.5	59.4 $\pm$ 25.4	63.5 $\pm$ 34.7	75.9 $\pm$ 14.2	352.8 $\pm$ 123.8
Equations	$\text{Lny} = 8.76 - 0.30x^{0.5}$ $r^2 = 0.974$	$\text{Lny} = -1.07 + 32.67 / \text{Lnx}$ $r^2 = 0.981$	$\text{Lny} = -0.77 + 31.77 / \text{Lnx}$ $r^2 = 0.948$	$\text{Lny} = -0.69 + 31.84 / \text{Lnx}$ $r^2 = 0.963$	

where y = time to reach the stage, and x = concentration of the essential oil of *L. alba* ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )

**Table 2.** Hematological parameters (%) of slender seahorses transported in plastic bags with the essential oil of *L. alba* ( $15 \mu\text{L L}^{-1}$ ). N= 10 for each treatment tested.

Treatment	Lymphocytes	Neutrophils	Monocytes	Thrombocytes	Eosinophils	Basophiles
Before transport	63.4±5.6 <sup>a</sup>	3.33±1.4 <sup>a</sup>	9.5±2.2 <sup>a</sup>	4.08±1.3 <sup>a</sup>	7.50±4.8 <sup>a</sup>	12.17±4.3 <sup>a</sup>
OE 4h	56.2±6.5 <sup>a</sup>	4.33±2.4 <sup>a</sup>	7.67±4.1 <sup>a</sup>	6.17±5.8 <sup>a</sup>	4.75±2.1 <sup>a</sup>	20.83±11.9 <sup>a</sup>
Control 4h	55.9±5.8 <sup>a</sup>	6.87±3.8 <sup>a</sup>	16.91±5.0 <sup>a</sup>	4.33±3.2 <sup>a</sup>	6.33±5.6 <sup>a</sup>	11.58±5.6 <sup>a</sup>
OE 24h	54.00±7.2 <sup>a</sup>	4.75±1.9 <sup>a</sup>	8.10±2.46 <sup>a</sup>	4.50±3.3 <sup>a</sup>	11.08±8.3 <sup>a</sup>	15.08±7.4 <sup>a</sup>
Control 24h	36.62±5.2 <sup>b</sup>	11.70±5.2 <sup>b</sup>	12.8±13.4 <sup>a</sup>	4.08±1.9 <sup>a</sup>	19.3±17.3 <sup>a</sup>	15.42±14.9 <sup>a</sup>

Different letters in the columns indicate a significant difference between treatments based on two-way ANOVA and Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

## Figure Legend

**Fig. 1** –Blood glucose levels of seahorses transported in plastic bags (one seahorse per bag) for 4 or 24 h. N= 10.

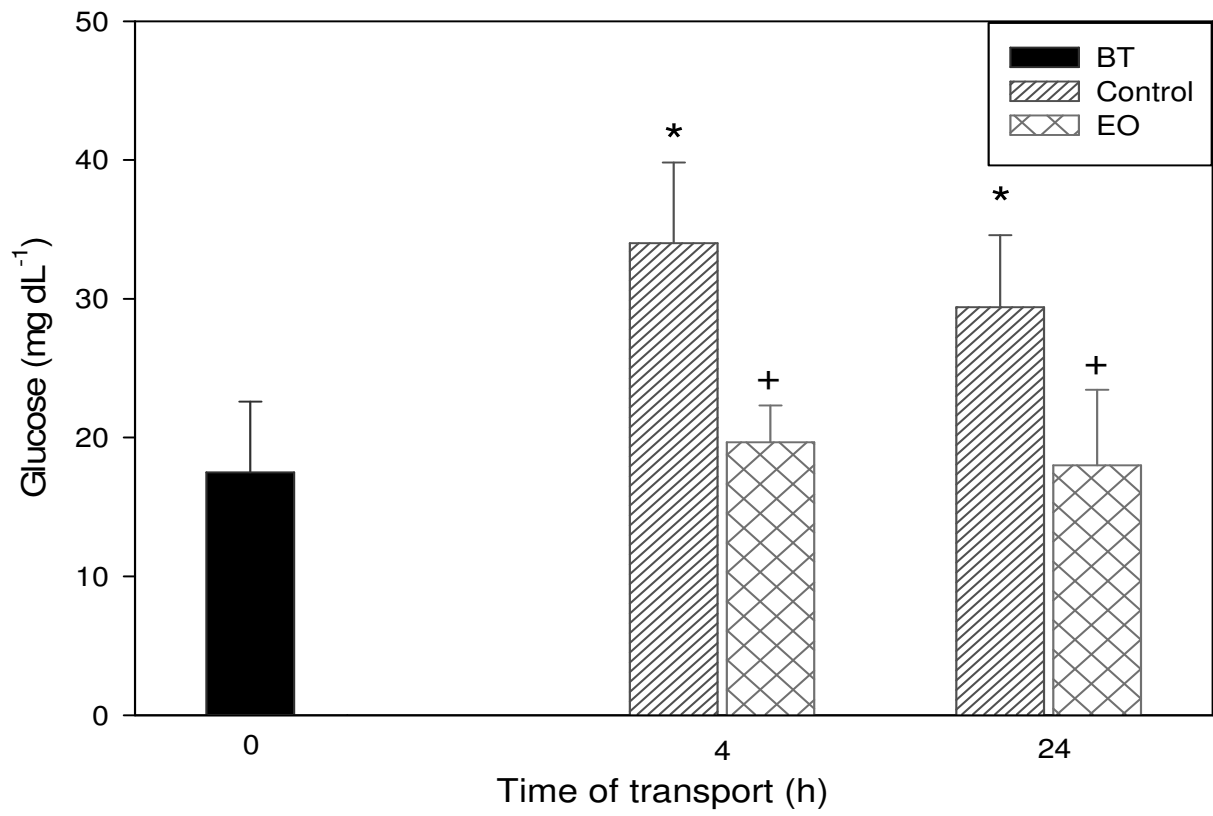
BT = Before transport

Control = only water

EO = essential oil of *L. alba* previously diluted in ethanol (1:10) 15  $\mu\text{L L}^{-1}$

\* significantly different from before transport using two-way ANOVA and Tukey's test (P < 0.05).

+ significantly different from control group at the same time of transport using two-way ANOVA and Tukey's test (P < 0.05).

**Fig. 1**

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso na aquicultura, principalmente na criação de peixes, está intimamente ligado aos avanços desenvolvidos na biologia, na nutrição, no manejo ambiental e no ciclo de produção. O máximo desenvolvimento e crescimento dos peixes pode ser afetado por uma série de fatores como doenças oportunistas, problemas fisiológicos e por deficiências no sistema imunológico. O estresse e as condições ambientais são problemas comuns e difíceis de controlar que afetam o desempenho e podem aumentar a susceptibilidade a doenças (STAYKOV et al., 2005). Somado a isso, às práticas de manejo usuais na aquicultura também contribuem como fatores de estresse aos peixes.

Neste sentido, os estudos na busca de substâncias que minimizem este estresse têm crescido muito nos últimos anos. Atualmente a preocupação ambiental faz com que essa procura esteja voltada a produtos naturais que apresentem via de regra um menor potencial agressivo à natureza, causem menores reações adversas aos peixes, nos organismos aquáticos, nos manipuladores e tão pouco provoquem alterações que impossibilite o consumo dos produtos finais da produção.

O OE de *L. alba* foi utilizado neste estudo com a finalidade de ser uma alternativa viável ao uso na aquicultura, por existirem relatos de sua ação como sedativo e miorrelaxante na medicina popular. Os resultados comprovam sua eficácia como redutor de estresse em jundiás e cavalos marinhos, podendo ser utilizado com segurança tanto para indução anestésica, no caso de manejos como biometrias, análises patológicas, implantes hormonais, ou para o transporte dessas espécies. Também, foi possível constatar que o uso desse óleo essencial não impossibilita o consumo do filé dos peixes tratados imediatamente antes do abate.

A utilização do OE em outras espécies de peixes deve ser testada para que seja possível montar um guia com informações e concentrações indicadas a cada espécie de peixe nas diferentes situações (temperatura, dureza, pH da água).

Além do uso popular como sedativo e miorrelaxante de *L. alba*, preparações com outras espécies do mesmo gênero foram patenteadas para o tratamento de doenças crônicas e/ou inflamatórias (N° da patente N° WO2005058338) e para a

inibição da angiogênese (N° da patente DE10047835). Tudo isso leva a crer que seja interessante testar se existe atividade antibacteriana do OE de *L. alba* frente a bactérias patogênicas que causam grandes perdas na aquicultura.

Estudos da utilização de óleos essenciais como promotores de crescimento para peixes têm sido realizados, por exemplo, o óleo essencial de orégano (*Origanum heracleoticum* L.) foi adicionado à alimentação do catfish de canal (*Ictalurus punctatus*) e demonstrou sua eficiência favorecendo o crescimento e auxiliando no sistema imunológico dos peixes desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, diminuindo a mortalidade e o grau de infecção (ZHENG et al., 2009). Outros estudos como alternativas nutricionais como a adição de extratos vegetais em rações têm mostrado resultados positivos sobre o desempenho de peixes, aumentando a imunidade e conseqüentemente, ocasionando uma maior resistência às doenças comumente causadoras de prejuízos (SANTOS et al., 2009). Aditivos naturais fornecidos via dieta possuem, entre outras, a função de melhorar a flora intestinal em concentrações que poderão gerar resultados satisfatórios (MORIÑO et al., 2010).

Diante disso, verifica-se que existe a possibilidade de estudo do uso desta planta tão promissora para a piscicultura como promotor de crescimento e como um estimulante do sistema imunológico dos peixes.

## 4. CONCLUSÕES

O OE de *L. alba* é eficaz para sedação em jundiá nas concentrações de 5 a 20  $\mu\text{L/L}$  e para anestesia profunda de 100 a 500  $\mu\text{L/L}$ . O uso de 300  $\mu\text{L/L}$  deste óleo essencial inibe a elevação do cortisol plasmático após o estresse de manejo e exposição ao ar e não deixa sabor ou odor desagradável no filé.

Em cavalos marinhos esse OE mostrou-se efetivo para sedação (10-20  $\mu\text{L/L}$ ) e para anestesia profunda (50–450  $\mu\text{L/L}$ ). Além disso, 15  $\mu\text{L/L}$  do OE na água do transporte inibem a elevação da glicose sanguínea e conseqüentemente seu uso no transporte desta espécie é sugerido.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management.**, v. 17, p. 301–307, 1997.
- BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria, Ed. UFSM, 2004.
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009
- BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causa e consequência (Revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 6, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BARCELLOS, L. J. G. et al.. Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465-1469, 2003.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M., Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, p. 317–321, 2006.
- BARTON, B. A.; IWAMA, 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. Stress. In: Stickney, R. R. (Ed.), **Encyclopaedia of Aquaculture**. John Wiley and Sons, 2000, p. 892–898.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BIRON, M.; BENFEY, T. J. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 13, n.2 p. 153-160, 1994.
- BURKA, J. F.; et al. Drugs in salmonid aquaculture review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, p. 333–349. 1997.



- CARNEIRO, P. C. F.; MARTINS, M. L.; URBINATI, E. C. et al. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 555-560, 2002.
- CHABALIM, E.; MENDONÇA, I. O. I. Comercialização experimental da matrinxã (*Brycon c. f. cephalus*) (Pisces, Characidae) no mercado de Pirassununga. In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**. Piracicaba. Resumos. São Paulo, 1994. p.127.
- CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, n. 31, p. 537–546, 2000.
- CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, prelo.
- DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R.; GRAY, W. L. Effect of dietary cortisol on resistance of channel catfish to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus disease. **Aquaculture**, n. 218, p.121– 130, 2003.
- FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestéico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 71- 75, 2005.
- FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 90p. 1980.
- GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 7, p. 288– 292, 1987.
- GIMBO, R. Y. et al. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-raboamarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p. 350-357, 2008.
- GONÇALVES, A. F. N. et al. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, p. 339-344, 2008.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 10, p. 191-195, 1976.

- HISANO, H. et al. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp.. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, p. 303-307, 2008
- HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural**, v. 39, p. 577-579, 2009.
- INOUE, L. A. K. A.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L. A. K. A. et al. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. **Acta Amazonica**, v. 35, p. 289-295, 2005.
- IWAMA, G.; MCGEER, J.; PAWLUK, M. The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2065- 2073, 1989.
- IWAMA, G. et al. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.
- IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak<sup>®</sup> as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, p. 549- 566, 2003.
- KOLDEWEY, H. et al. Collection and Transportation of Seahorses, In: Syngnathid Husbandry in Public Aquariums. **Manual**, 137p. 2005.
- LANZILLOTTI, R. S.; LANZILLOTTI, H. S. Sensorial analysis under the focus of fuzzy logic. **Revista de Nutrição**, v. 12, n.2, p. 145-157, 1999.
- LOURIE, S. A.; VINCENT, A. C. J.; HALL, H. J. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. Project Seahorse, Londres, Inglaterra, 214 p. 1999.
- LOURIE, S. A.; FOSTER, S. J.; COOPER, E. W. T.; VINCENT, A. C. J. **A guide to the identification of seahorses**. Project Seahorse and TRAFFIC North America. Washington D.C.: University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000.
- 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.

- MGBENKA, B. O.; EJIOFOR, E. N. Effects of extracts of dried leaves of *Erythrophleum suaveolens* as anesthetics on clariid catfish. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 8, p. 73-80, 1998.
- MOYLE, P.B.; CECH Jr., J.J. **Fishes: an introduction to Ichthyology**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988.
- MONTEIRO-NETO, C. et al. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, Northeast Brazil. **Biodiversity Conservation**, v. 12, n. 6, p. 1287-1295, 2003.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.
- MORAES, M. A. C. M. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas : UNICAMP, 1993, 93 p. (Série Manuais).
- MORIÑO, J. L. P. et al. Utilização de probióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 20. n. 119. p. 42-47. 2010.
- PÁDUA, S.B. et al. Valores para o leucograma e trombograma de Juvenis de dourado (*salminus brasiliensis*) em condições experimentais de cultivo, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 31, n. 4, p. 282-287, 2009.
- PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PEREIRA - DA - SILVA, E. M. et al. M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009.
- PROJECT SEAHORSE. *The seahorse trade*. Disponível em: <<http://www.projectseahorse.org>>, Acesso em 07 de Abr. de 2009.
- RIBEIRO, S. C. A. **Secagem e defumação líquida de filé de peixe matrinhã (*Brycon cephalus*)**. Campinas, 2000, 101f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- RIBAS, L., FLOS, R., REIG, L., MACKENZEI, S., BARTON, B.A., TORT, L., Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, 269, 250-258, 2007.

- ROSA, I. M. L.; DIAS, T. L.; BAUM, J. K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 64, n. 4, p 378, 2002.
- ROSA I. M. L. et al. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, p. 1, n. 12, 2005.
- ROSA, I. L. et al. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 5, p. 405-414, 2007.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals** 2nd ed. London: Blackwell, 2008.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 1056-1061, 2005.
- SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, M. R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p.789-800. 2009.
- SAYDMOHAMMED, M.; PAL, A.K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.298 p.162–167, 2009.
- SEIGNEUR,G.N. Eficacia del Ms-222, quinaldina y benzocaina como anestésicos em *Rhamdia sapo*. **Memorias de la Asociacion Latinoamericana de Acuicultura**, v. 5, n. 3, p.633-639, 1984.
- SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n° 4, p.1001-1017, 2009.
- SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156 p. (PhD Thesis) - Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.
- SLADKY, K.K. et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachpomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.337– 342, 2001.
- SMALL, B.C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors.**Aquaculture**, v. 238, p. 469-481, 2004.
- STAURNES, M.; et al. Physiological effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 119, p. 381-391, 1994.

- STAYKOV, Y.; SPRING, P; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 153-161, 2007.
- SUEZILDE C. A.R.; TOBINAGA, S. Avaliação sensorial de filés de atrinchã (*Brycon cephalus*) processados por métodos combinados. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.2, p.101-106, 2002
- SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anaesthesia, surgery and related techniques, in Schrek, C.B., Moyle, P.B. methods for fish biology, capítulo 8, **American Fishery Society**, 684 p., 2000.
- TAVARES, M.; et al. Métodos sensoriais, físicos e químicos para análise de pescado: controle de qualidade de pescado. In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DA QUALIDADE NA INDÚSTRIA DO PESCADO, 1998, São Paulo. **Anais...** Santos: Universidade Católica de Santos-UNISANTOS, p.117- 134, 1998.
- TERBLANCHE´, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, 471–485. 1996.
- US FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry: concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish**. Rockville, 2007. (April 24).
- US FDA (Food and Drug Administration) **Animal & Veterinary Designations list**. June 6<sup>th</sup>, 2010. Acesso em: 25 jun. 2010. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/MinorUseMinorSpecies/ucm125445.htm>
- VINCENT, A. C. J. **The international trade in seahorses**. TRAFFIC International, Cambridge, 163p. 1996.
- VALE, T. G. et al., Behavioral effects of essential oil from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 127-33, 1999.
- VIDAL, L. V. O. et al. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p.275-279, 2006.
- VIDAL, L. V. O. et al. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p. 357-362, 2007a.

- VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 335-342, 2007 b.
- WABNITZ, C.; et al. **From ocean to aquarium**. UNEP-WCMC, 431 Cambridge, 65p. 2003.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, n. 211, p.353–366, 2003.
- WATTS B.M. et al. **Métodos sensoriais básicos para la evaluación de alimentos**. Traducción: Oficina de Traducciones, Secretaria de Estado. Ottawa : Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. 170 p. 1992.
- WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. Stress and acclimatation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. **American Fisheries Society**, Bethesda, Maryland, USA. 451–489 pp. 1990.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- ZHENG, Z.L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum*) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, n. 292. p. 214-218. 2009.
- ZÉTOLA, M. et al. Activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melisse). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207-215, 2002.