

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

**ATIVIDADE ANESTÉSICA EM ROBALOS-PEVA
(*Centropomus parallelus*) E CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez
(Lauraceae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Simoni Moraes Tondolo

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**ATIVIDADE ANESTÉSICA EM ROBALOS-PEVA
(*Centropomus parallelus*) E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Nectandra megapotamica*
(Spreng.) Mez (Lauraceae)**

por

Juliana Simoni Moraes Tondolo

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

**Orientadora: Prof. Dr. Berta Maria Heinzmann
Coorientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto**

Santa Maria, RS, Brasil

2011

T663a Tondolo, Juliana Simoni Moraes
Atividade anestésica em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e
caracterização química do óleo essencial das folhas de *Nectandra*
megapotamica (Spreng.) Mez (Lauraceae) / por Juliana Simoni Moraes
Tondolo. – 2011.
76 f. : il. ; 31 cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann.

Coorientador: Bernardo Baldisserotto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, RS, 2011

1. Óleo essencial 2. *Nectandra megapotamica* 3. *Centropomus*
Parallelus 4. Anestesia 5. Estresse 6. Terpenóide I. Heinzmann,
Berta Maria II. Baldisserotto, Bernardo III. Título.

CDU 615:639.3

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733
Biblioteca Central da UFSM

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

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

ATIVIDADE ANESTÉSICA EM ROBALOS-PEVA (*Centropomus parallelus*) E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)

elaborada por
Juliana Simoni Moraes Tondolo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta M. Heinzmann, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Luís André Nassr de Sampaio, Dr. (FURG)

Ionara Irion Dalcol, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 14 de dezembro de 2011.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da segunda chance e ao Dr. Waldir Veiga Pereira por ser o portador dessa dádiva e pela sua dedicação ferrenha na luta contra o câncer.

Ao meu amado esposo, parceiro e amigo Érico, teu amor, teu apoio e nossa vitória são motivos de uma felicidade indescritível. Teu carinho e dedicação foram essenciais em ambas as conquistas.

À minha família, pais, irmãos, sogros e cunhados, que sempre estiveram presentes, incentivando, acreditando, torcendo e ajudando, mesmo com um simples sorriso, um abraço. Quem tem uma família unida, nunca estará só e vencerá sempre.

Aos professores Berta e Bernardo pelo apoio, paciência e compreensão para a realização deste trabalho. A dedicação, seriedade e a paixão pela ciência que vocês transpiram têm caráter exemplar. Obrigado pela atenção que sempre recebi em todos os nossos encontros.

Ao professor Levy de Carvalho Gomes e seus orientandos, Larissa Novaes Simões e Bruno Ferreira da Silva, do laboratório de Ecotoxicologia Aquática, sem vocês este trabalho não seria possível.

Aos colegas dos laboratórios de Extrativos vegetais e de Fisiologia de peixes. Sou grata pela ajuda e presteza que sempre recebi de todos.

A todos os amigos e instituições que durante esta pesquisa foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE ANESTÉSICA EM ROBALOS-PEVA (*Centropomus parallelus*) E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)

AUTORA: JULIANA SIMONI MORAES TONDOLO

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

COORIENTADOR: BERNARDO BALDISSEROTTO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de dezembro de 2011

A crescente expansão da aquicultura, o estresse imposto aos animais nos sistemas de cultivo e os efeitos adversos causados pelos anestésicos de uso convencional têm levado ao incentivo da pesquisa por anestésicos de origem natural, eficazes e mais seguros, com menos efeitos colaterais e menores efeitos residuais. Neste contexto, esta dissertação objetivou a avaliação do potencial anestésico do óleo essencial (OE) das folhas de *Nectandra megapotamica* em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e sua caracterização química. Para a extração do OE, as folhas foram classificadas em jovens (OE-J) e velhas (OE-V) e a análise de sua composição química foi realizada por CG/EM. Os constituintes majoritários foram: biciclogermacreno (46.5/34.6%), α -pineno (26.8/26.2%), β -pineno (7.9/12.3%) e germacreno D (9.6/9.1%). O potencial anestésico do OE foi avaliado através dos tempos de indução e recuperação da anestesia e as respostas bioquímicas geradas pelo manuseio e transporte dos peixes. No primeiro experimento, quatro concentrações de cada OE foram testadas em robalos-peva aclimatados a duas salinidades (0 e 33 ‰) para avaliar os tempos de indução e recuperação da anestesia. No segundo experimento, duas concentrações do OE-V foram testadas em robalos-peva aclimatados às duas salinidades para avaliar os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse (níveis plasmáticos de glicose, lactato, Na^+ e K^+) causado pelo manuseio. No terceiro experimento, os peixes foram transportados em sacos plásticos nos dois tipos de água e com duas concentrações do OE-V, com a finalidade de avaliar a qualidade da água e a mortalidade pós-transporte. Ambos OEs produziram sedação leve na concentração de $30 \mu\text{L L}^{-1}$ e anestesia profunda com $150 \mu\text{L L}^{-1}$. O OE-V não foi eficaz em evitar o estresse do manuseio, pois os elevados níveis plasmáticos de glicose e lactato observados nos controles também foram detectados nos grupos tratados. Os tratamentos não modificaram significativamente os níveis séricos de Na^+ e K^+ nos peixes em ambas as salinidades. Durante o experimento de transporte, o uso do OE-V não preveniu a deterioração da qualidade da água nem a mortalidade pós-transporte. Ao contrário, o grupo transportado com a concentração mais elevada do OE-V em água salgada apresentou uma mortalidade significativamente maior em relação aos demais grupos. Concluindo, o OE de *N. megapotamica* mostrou-se eficiente para indução de sedação e anestesia em robalos-peva nas concentrações testadas, mas não foi eficaz em prevenir o estresse gerado pelo manuseio e transporte nessa espécie.

Palavras-chave: óleo essencial, *Nectandra megapotamica*, *Centropomus parallelus*, anestesia, estresse, tenipenóis

ABSTRACT

Thesis of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANESTHETIC ACTIVITY IN FAT SNOOK (*Centropomus parallelus*) AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)

**AUTHOR: JULIANA SIMONI MORAES TONDOLO
ADVISER: BERTA MARIA HEINZMANN**

Date and Location of Defense: Santa Maria, December 14, 2011

The increasing expansion of aquaculture, the stress on the animals in farming systems and the adverse effects caused by conventional anesthetics has encouraged the search for natural anesthetics, safer, more effective, with lower side effects and less residual waste. In this context, this work aimed to evaluate the anesthetic potential of the essential oil (EO) from leaves of *Nectandra megapotamica* in fat snook (*Centropomus parallelus*) and its chemical composition. For extraction of the EO, the leaves were separated in young (EO-Y) or old (EO-O) and chemical composition analysis was performed by GC/MS. The major constituents of the Y and O-EOs were: bicyclogermacrene (46.5/34.6%), α -pinene (26.8/26.2%), β -pinene (7.9/12.3%), and germacrene D (9.6/9.1%). In the first experiment, four different concentrations of each EO were tested in fat snook acclimated to two salinities (zero and 33 ppt) to evaluate anesthesia induction and recovery time. In the second experiment, two concentrations of EO-O were tested in fish acclimated to both salinities for the evaluation of stress parameters (glucose, lactate, Na^+ and K^+ plasma levels) caused by handling. In the third experiment, the fish were transported in plastic bags, supplied with both water salinities and two concentrations of EO-O for evaluation of water quality and mortality after transport. Mild sedation was achieved at $30 \mu\text{L L}^{-1}$ and deep anesthesia at $150 \mu\text{L L}^{-1}$ with both EO. The EO-O was not able to avoid the stress of handling, as evidenced by elevated glucose and lactate plasma levels observed in all treatments and controls. The treatments did not change significantly the plasma Na^+ and K^+ levels in the fish kept at both salinities. During transportation, the use of EO-O did not improve the water quality and post-transport mortality. On the contrary, the fish transported with the highest concentration of EO-O in seawater had significantly higher mortality than the other groups. In conclusion, the EO of *N. megapotamica* at the tested concentrations was efficient to induce sedation and anesthesia in fat snook, but was not effective in preventing the stress generated by handling and transport of this species.

Keywords: essential oil, *Nectandra megapotamica*, *Centropomus parallelus*, anesthesia, stress, terpenoids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies da família Lauraceae utilizadas na medicina popular, relacionando as partes utilizadas, forma de uso e as suas utilizações medicinais (Adaptado de Marques, 2001) 16

Tabela 2 - Alguns agentes anestésicos sintéticos e naturais e concentrações testadas para indução de anestesia profunda em diferentes espécies de peixes..... 27

Tabelas do artigo

Table 1 - Regression equations relating the time required for the induction and recovery from anesthesia using the essential oils of *Nectandra megapotamica* in fat snook juveniles..... 49

Table 2- Tissue water content (%) in fat snook *Centropomus parallelus*, under control conditions (AC – aquarium control; BC – basal control) or submitted to the essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (30 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$)..... 49

Table 3 - Water parameters after the transport of fat snook *Centropomus parallelus* in plastic bags with the essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (15 or 30 $\mu\text{L L}^{-1}$) or ethanol (E) added to the water..... 50

Table 4 - Constituents of the young (EO-Y) and old leaves (EO-O) essential oil of *Nectandra megapotamica*..... 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A- <i>Nectandra megapotamica</i> , coletada no Morro do Elefante, Santa Maria – RS; B: galho contendo folhas jovens e velhas.	13
Figura 2- Mapa da distribuição da família Lauraceae, com regiões de ocorrência sinalizadas em vermelho (Fonte: Villamizar, 2010)	15
Figura 3 - Unidade de isopreno – C ₅ (1), monoterpene – C ₁₀ (2), sesquiterpene – C ₁₅ (3) e fenilpropanóide (4). Adaptado de Baser e Buchbauer, 2010.....	21
Figura 4 - Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários (Adaptado de Buchanan <i>et al.</i> , 2000); MEP = metileritritol	22
Figura 5 – Fotografia do Robalo-peva (<i>C. parallelus</i>). Fonte: Fish Base	30
Figuras do artigo:	
Figure 1 - Time (in seconds) required for the induction and recovery from anesthesia using the essential oil of <i>Nectandra megapotamica</i> in fat snook.....	52
Figure 2 - Plasma glucose (A), lactate (B), Na ⁺ (C) and K ⁺ (D) levels in fat snook <i>Centropomus parallelus</i> acclimated to fresh- or seawater and exposed for 10 min to the essential oil-O of <i>Nectandra megapotamica</i> (30 and 300 μL L ⁻¹).	53
Figure 3 - Mortality after the transport of fat snook <i>Centropomus parallelus</i> in plastic bags with essential oil-O of <i>Nectandra megapotamica</i> (15 or 30 μL L ⁻¹) or ethanol (E) added to the water.	54

LISTA DE ABREVIACES

AC – controle aqurio
ANOVA - Análise de varincia
BC – controle basal
Cl⁻ - in cloro
CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa
E – controle etanol
EPM – erro padrão da média
EO-Y – igual OE-J
EO-O – igual OE-V
FDA – Food and Drug Administration
g – grama
GABA_A – receptor para o ácido gama-aminobutírico
GC/MS – igual CG/EM
h – hora
K⁺ - in potássio
kg - quilo
L – litro
min – minuto(s)
mg - miligrama
MS-222 – metanossulfonato de tricina
µL - microlitros
Na⁺ - in sódio
OE – leo essencial
OE-J – leo essencial de folhas jovens
OE-V – leo essencial de folhas velhas
ppt - partes por mil
µg - micrograma
SEM – igual EPM
W – controle água
‰ – igual ppt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Família Lauraceae.....	15
2.1.1. Gênero <i>Nectandra</i> Rol. ex Rottb.....	17
2.1.2. <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.....	18
2.2. Óleos essenciais.....	20
2.2.1. Óleos essenciais em espécies de Lauraceae.....	23
2.3. Anestesia em peixes.....	24
2.3.1. Anestésicos sintéticos mais utilizados.....	26
2.3.2. Anestésicos de origem natural.....	28
2.4. <i>Centropomus parallelus</i> (POEY).....	29
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. Manuscrito.....	32
Title: Anesthetic effect of <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez essential oil on the handling and transport of fat snook <i>Centropomus parallelus</i>	33
1. Introduction.....	34
2. Materials and methods.....	35
3. Results.....	38
4. Discussion.....	41

5. Conclusion.....	43
References	44
5. DISCUSSÃO GERAL.....	55
6. CONCLUSÕES	61
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXOS	74
9.1. Cromatograma do óleo essencial das folhas jovens de <i>Nectandra megapotamica</i> obtido através de CG/MS.....	74
9.2. Cromatograma do óleo essencial das folhas velhas de <i>Nectandra megapotamica</i> obtido através de CG/MS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Por milhares de anos os produtos naturais têm desempenhado um papel importante em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças, sendo as plantas superiores as que apresentam um maior histórico de uso (Chin *et al.*, 2006). Estima-se que cerca de 250 mil espécies de plantas com floração ocorrem em todo o mundo, dentre essas, 125 mil são encontradas em florestas tropicais. Elas contribuem fornecendo produtos químicos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos e representam uma grande fonte de novas moléculas, visto que apenas 1% tem seu potencial farmacêutico estudado (Jachak e Saklani, 2007).

Com o passar das décadas, o interesse por fármacos originados de plantas superiores, especialmente as fitoterapêuticas, tem aumentado expressivamente. Calcula-se que cerca de 25% dos medicamentos modernos são direta ou indiretamente originados de plantas superiores (Fabricant e Farnsworth, 2001). Em casos particulares, como o de fármacos antitumorais, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis no mercado e a maioria dos que estão na fase final de testes clínicos são derivados de produtos naturais, principalmente plantas superiores (Calixto, 2000; Newman e Cragg, 2007).

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. É conhecida por apresentar grande importância econômica, seja pelo uso da madeira, na culinária e na medicina popular, entre outros. Na indústria madeireira o gênero *Ocotea* é o mais utilizado, mas outros gêneros, como *Aniba* e *Nectandra*, também são úteis para marcenaria e construção civil (Marques, 2001). Várias especiarias de uso popular provêm desta família, por exemplo, louro, canela, cânfora e sassafrás (Simic *et al.*, 2004).

O uso etnofarmacológico desta família é bastante abrangente, tanto em relação aos gêneros utilizados quanto à diversidade de uso das espécies. Quanto aos gêneros, destacam-se *Ocotea*, *Aniba*, *Cinnamomum*, *Persea*, *Nectandra* e quanto aos usos, variam de estomáquicos, tônicos, emenagogos, sudoríficos até antifúngicos e antibióticos, entre outros (Marques, 2001).

Vários gêneros dessa família são produtores de óleos essenciais, sendo as espécies mais conhecidas: *Cryptocarya moschata* Nees (noz-moscada-brasileira), *Lindera benzoin* (L.) Blume (produtora do óleo-de-benjoim), *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl (cânfora), e *Aniba roseodora* Ducke (pau-rosa), da qual se extrai a essência para a fabricação do famoso perfume francês Chanel nº5 (Coe-Teixeira, 1980).

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis naturais, caracterizados por um odor intenso e são sintetizados por plantas aromáticas. Como também ocorre com outros metabólitos secundários na natureza, os óleos voláteis desempenham um importante papel na proteção das plantas atuando como antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros (Bakkali *et al.*, 2008).

A aplicação dos óleos essenciais é bastante variada, sendo amplamente utilizados para produção de perfumes, cosméticos, produtos alimentícios, farmacêuticos e de higiene, por apresentarem atividades terapêuticas, como aromatizantes e flavorizantes. Estudos com óleos essenciais têm demonstrado uma ampla variedade de atividades: antimicrobiana (Dorman e Deans, 2000), antifúngica (Simic *et al.*, 2004), acaricida (Macchioni *et al.*, 2006), antitumoral (Edris, 2007), antioxidante (Garcez *et al.*, 2009), antiparasitária (Silva *et al.*, 2009) entre outras.

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez (Fig. 1) é uma espécie arbórea pertencente à família Lauraceae e que apresenta ampla distribuição nas florestas nativas do Rio Grande do Sul, sendo conhecida popularmente como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta (Tonini *et al.*, 2003). O uso etnofarmacológico desta espécie dá-se, principalmente, como analgésico, antirreumático (Da Silva Filho *et al.*, 2008) e calmante (Alves *et al.*, 2008). O óleo essencial desta espécie demonstrou atividade antiinflamatória e antitumoral (Apel *et al.*, 2006).

A costa brasileira tem várias espécies de peixes marinhos com grande potencial para a aquicultura, incluindo o robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Esta espécie é de grande interesse para a pesca comercial e esportiva e é utilizada para repovoamento das lagoas costeiras (Barbosa *et al.*, 2011). Sua produção em larga escala é limitada pela dificuldade de produzir grandes quantidades de juvenis, devido à alta taxa de mortalidade nesta fase (Temple *et al.*, 2004).

O manejo e transporte dos animais nos sistemas de cultivo podem gerar estresse e afetar tanto a saúde quanto a sobrevivência dos animais (Ashley, 2007). A sedação e anestesia dos peixes é um procedimento necessário para minimizar o estresse gerado pelas atividades da aquicultura, como manuseio e transporte. Pesquisadores têm envidado esforços para entender como a melhora do bem-estar animal correlaciona-se com menor estresse e este, por sua vez, com melhor rendimento e qualidade do produto (Neiffer e Stamper, 2009; Maricchiolo e Genovese, 2011).



Figura 1 - A- *Nectandra megapotamica*, coletada no Morro do Elefante, Santa Maria – RS; B: galho contendo folhas jovens e velhas.

Existem vários agentes anestésicos aprovados para uso em aquicultura, tais como: benzocaína, metanossulfonato de tricaína (MS-222), sulfato de quinaldina, 2-fenoxietanol e isoeugenol (Aqui-S™) (Ross e Ross, 2008). Como os agentes anestésicos comumente empregados apresentam efeitos indesejáveis, estudos com produtos naturais, entre eles os óleos essenciais, têm sido conduzidos (Inoue *et al.*, 2003).

A atividade anestésica de óleos essenciais em diferentes espécies de peixes já foi demonstrada para óleo de cravo, cujo principal constituinte é o eugenol (Inoue *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2010b), para o óleo de espécies do gênero *Mentha* e para o seu constituinte majoritário, o mentol (Façanha e Gomes, 2005; Gonçalves *et al.*, 2008; Simões e Gomes, 2009) e também para o óleo essencial de *Lippia alba* (Cunha *et al.*, 2010a) e para o óleo essencial de *Melaleuca* (Hajek, 2011).

Diante deste contexto, o presente trabalho avaliou: a) o potencial anestésico dos óleos essenciais das folhas jovens e velhas de *N. megapotamica* em robalo-peva, através da avaliação dos tempos de indução e recuperação da anestesia; b) o efeito sobre parâmetros bioquímicos e osmorregulatórios relacionados ao estresse causado pelo manuseio e transporte;

c) a composição química dos óleos essenciais, comparando-a com outros trabalhos e relacionando as substâncias presentes nestes OEs à atividade anestésica observada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família Lauraceae

A família Lauraceae compreende 50 gêneros e aproximadamente 2.500 a 3.000 espécies que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (Van Der Werff e Richter, 1996) de ambos os hemisférios (Fig. 2), concentradas em florestas pluviais, principalmente no sudeste da Ásia e no Brasil (Romoff *et al.*, 2010).

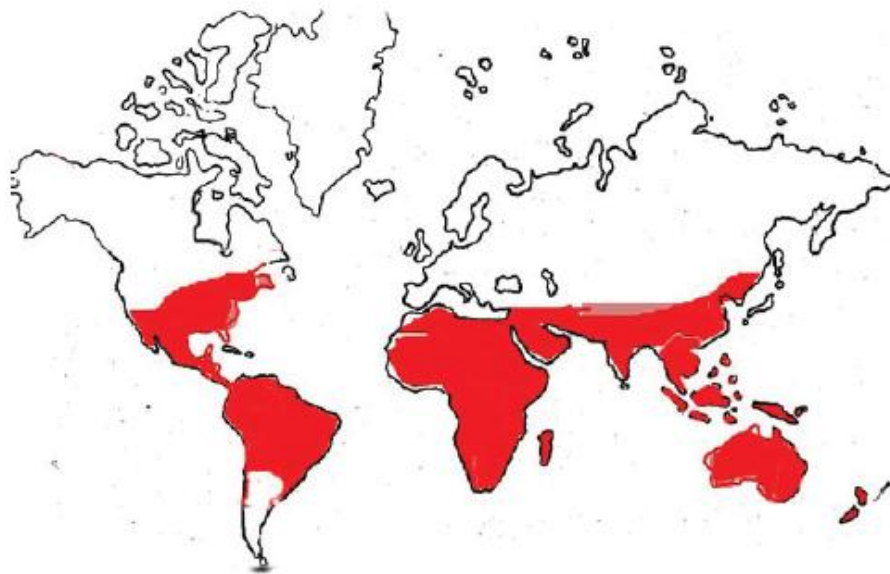


Figura 2- Mapa da distribuição da família Lauraceae, com regiões de ocorrência sinalizadas em vermelho (Fonte: Villamizar, 2010)

As Lauráceas destacam-se entre as outras famílias por sua importância econômica, sendo que algumas espécies fornecem madeira de excelente qualidade, outras são utilizadas na culinária, na medicina popular, na fabricação de papel e em indústrias químicas e farmacêuticas. As espécies aromáticas, produtoras de óleo essencial, apresentam alto valor comercial (Marques, 2001).

Os primeiros registros relativos à utilização das espécies dessa família datam de 2.800 a.C, sendo originários da Grécia antiga. Isso influenciou o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época. Por exemplo, o gênero *Phoebe* tem seu nome relacionado ao deus Apolo e *Laurus* L. vem do celta “*lauer*” que significa verde ou ainda, “*laus*” que significa louvor. Além destes dois gêneros, outras espécies utilizadas na época eram pertencentes ao gênero *Cinnamomum* Schaeffer, que significa “caneleira” em grego (Coe-Teixeira, 1980).

As folhas de *Laurus nobilis*, popularmente conhecida como louro, a canela em pó e a canela em pau, obtidas das cascas do caule de *Cinnamomum zeylanicum* e *C. cassia* são amplamente utilizadas como condimento. Os frutos de *Persea americana* e *P. gratissima*, conhecidos como abacate, são mundialmente consumidos para fins alimentícios (Marques, 2001).

Na medicina popular, as espécies da família Lauraceae apresentam utilização variada, tendo seu uso preconizado contra diversas doenças (Tabela 1). O gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais e as espécies aromáticas pertencem, principalmente, aos gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea* e *Licaria* (Marques, 2001). Entre as atividades biológicas e farmacológicas destacam-se: citotóxica, antiinflamatória, antifúngica, antinociceptiva e antitumoral (Villamizar, 2010).

Tabela 1 – Espécies da família Lauraceae utilizadas na medicina popular, relacionando as partes utilizadas, forma de uso e as suas utilizações medicinais (Adaptado de Marques, 2001)

Nome científico	Parte utilizada	Forma de uso	Propriedades medicinais
<i>Aniba canellita</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Aniba duckei</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Aniba hastmanniana</i>	Lenho, casca	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Aniba riparia</i>	Fruto, cálices persistentes	Extrato hidroalcoólico	Como antibacteriana
<i>Cinnamomum cassia</i>	Casca, folha	Infusão	Contra gripes
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Casca, folha	Infusão	Contra gripes
<i>Cryptocaria moschata</i>	Fruto	Infusão	Contra dores de estômago
<i>Laurus nobilis</i>	Folha	Infusão, decoção, unguento	Nos casos de afecções gástricas, reumáticas, flatulência, como anti-espasmódica, sudorífica, cicatrizante de feridas e úlceras (uso externo)
<i>Licaria puchury-major</i>	Casca	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Nectandra pichurim</i>	Folha, fruto	Infusão	Nos casos de cólicas e problemas gástricos
<i>Nectandra rodiaei</i>	Lenho	Tintura, extrato, vinho, elixir	Como antipirético e tônico
<i>Ocotea cymbarum</i>	Lenho	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Ocotea guianensis</i>	Casca, folha	Infusão	Nos casos de abscessos
<i>Ocotea indecora</i>	Casca	Infusão	Como sudorífica, anti-reumática e anti-sifilítica
<i>Ocotea pretiosa</i>	Lenho	Extrato (coobação)	Contra o ancilostomídeo humano
<i>Ocotea pulchella</i>	Folha, casca	Infusão	Como estomáquico, emenagogo e tônico uterino
<i>Ocotea spectabilis</i>	Raiz, casca	Infusão	Como tônico
<i>Ocotea teleiandra</i>	Folha, casca	Infusão	Nos casos de dores no peito, como sudorífico
<i>Persea americana</i>	Folha	Infusão	Nos casos de problemas renais, como diurético e calmante
<i>Persea cordata</i>	Casca	Extrato hidroalcoólico	Como antibacteriana
<i>Persea gratissima</i>	Semente	Extrato metanólico	Como antitumoral

Obs.: as descrições de usos populares correspondem aos termos utilizados pela população

No Brasil, a família Lauraceae é representada por 19 gêneros e 390 espécies, sendo encontradas 30 espécies no estado do Rio Grande do Sul - RS, onde se destacam *Aiouea saligna*, *Ocotea* spp. e *Nectandra* spp. (Ceolin *et al.*, 2009). Em um estudo fitossociológico, realizado na região de Santa Maria (RS), foi observada a presença de várias espécies da família Lauraceae, representadas principalmente pelos gêneros *Ocotea* e *Nectandra* (Longhi *et al.*, 2000).

2.1.1. Gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb

Nectandra Rol. ex Rottb está entre os gêneros mais representativos da família Lauraceae, sendo restrito às Américas Tropical e Subtropical. O gênero é representado por 114 espécies reconhecidas até o presente e, destas, 43 são brasileiras, apresentando grande diversidade nas florestas Amazônica e Atlântica (Baitello *et al.*, 2003). O primeiro centro de diversidade do gênero se encontra nas falhas orientais dos Andes e na região da Amazônia peruana e o segundo, no sudeste brasileiro (Rohwer, 1993 apud Alves e Sartori, 2009). O gênero é composto por árvores monóicas de folhas peninérveas alternas, raras opostas e subopostas (Baitello *et al.*, 2003). A maioria dos representantes produz frutos relativamente pequenos que tem grande importância ecológica no sustento de várias espécies de pássaros (Krügel *et al.*, 2006).

As espécies de *Nectandra* são importantes do ponto de vista econômico, pois sua madeira é usada para construção civil e moveleira, sendo considerada de boa qualidade, com exceção daquelas que desprendem odor desagradável, o que limita seu uso (Rohwer, 1993 apud Zanon *et al.*, 2009).

Quimicamente o gênero é caracterizado pela presença de lignoides (Gottlieb, 1972), alcaloides dos grupos bisbenzilquinolínico (Böhlke *et al.*, 1996), aporfínico e indólico (Santos Filho e Gilbert, 1975), lignanas tetraidrofurânicas (Da Silva Filho *et al.*, 2004a), neolignanas (Aiba *et al.*, 1977), monoterpenos e sesquiterpenos (Gottlieb *et al.*, 1981).

Quanto à composição química do óleo essencial, algumas espécies têm sido estudadas: *N. angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees (Torres *et al.*, 2005), *N. coriacea* (Sw.) Griseb. (Marbot *et al.*, 2005 apud Romoff *et al.* 2010) *N. elaiophora* Barb. Rodr. (Navis, 1951 apud Romoff *et al.*, 2010) *N. salicina* C. K. Allen (Ciccio *et al.*, 2009), *N. rigida* (Kunt) Nees (Morais *et al.*, 1972 apud Ciccio *et al.*, 2009), *N. umbrosa* (Kunt) Mez (Valley e Scora, 1999) e *N. megapotamica* (Spreng.) Mez (Romoff *et al.*, 2010).

Algumas espécies do gênero *Nectandra* são usadas na medicina popular para promover cicatrização de lesões e como preparações antirreumáticas, digestivas e diuréticas e

também como antifúngicas, antidiarreicas e analgésicas (Melo *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado a atividade biológica de certas espécies, por exemplo, antitumoral do extrato etanólico de *N. rigida* (Le Quesne *et al.*, 1980) e *N. grandiflora* Ness & C. Mart. ex Nees (Moreno *et al.*, 1993), antimalárica do extrato metanólico de *N. salicifolia* (Kunt) Nees (Böhlke *et al.*, 1996) e do extrato hidroalcoólico de *N. cuspidata* Nees & Mart. (Muñoz *et al.*, 2000), bem como antinflamatória do extrato metanólico de *N. falcifolia* (sin. *N. angustifolia*) (Melo *et al.*, 2006).

2.1.2. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez

No Brasil, a espécie *Nectandra megapotamica* ocorre nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Possui ampla distribuição pelas principais florestas do Rio Grande do Sul, ocorrendo na Floresta do Alto Uruguai, nos sub-bosques dos pinhais do Planalto, na Floresta da Fralda da Serra Geral, na Floresta Pluvial Atlântica e no Escudo Sul-Rio-Grandense. É conhecida popularmente como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta (Tonini *et al.*, 2003).

Como sinônimos botânicos foram encontrados: *N. briquetti* Hassl., *N. membranacea* (Spreng.) Hassl., *N. membranacea* fo. *floribunda* Hassl., *N. membranacea* var. *saligna* (Nees) Hassl., *N. racemifera* Meisn., *N. saligna* Nees, *N. saligna* var. *obscura* Meisn., *N. tweediei* (Meisn.) Mez, *Oreodaphne tweediei* Meisn., *O. tweediei* var. *cymulosa* Meisn., *Strychnodaphne suaveolens* Griseb. e *Tetranthera megapotamica* Spreng. (Tropicos.Org).

É uma espécie perenifólia de grande porte, apresentando até 30 m de altura e tronco com até 80 cm de diâmetro, com frutos ovoides que maturam no verão e servem de alimento para espécies de pássaros (Krügel *et al.*, 2006). Fornece uma madeira semelhante à imbuia (*Ocotea porosa*), adequada para a construção civil, esquadrias e tabuados em geral, porém é pouco utilizada devido ao seu odor desagradável (Tonini *et al.*, 2003).

Popularmente a casca desta espécie é utilizada para aliviar a dor e como antirreumática (Da Silva Filho *et al.*, 2004a). O chá das folhas é usado como calmante e no tratamento de tosses e gripes, já a casca desfiada e aquecida usa-se para o tratamento de abscessos (Alves *et al.*, 2008).

Estudos fitoquímicos de extratos etanólicos desta espécie mostraram a presença de sesquiterpenos, fenilpropanoides e flavonoides nas cascas e folhas (Miguita *et al.*, 2007), lignanas tetraidrofurânicas nas folhas (Da Silva Filho *et al.*, 2004a) e alcaloides indólicos nas cascas (Smith, 1977).

Em relação à composição do óleo essencial (OE), estudo de Romoff *et al.* (2010) sobre variação circadiana e sazonal do OE extraído das folhas de *N. megapotamica* não mostrou diferença entre as amostras, apresentando como constituinte majoritário α -bisabolol (62-69%). Em outro estudo, realizado com três indivíduos avaliando variação sazonal, observou-se uma variação qualitativa no OE das folhas, sendo α -santaleno (17,42%) e β -santaleno (9,23%) os majoritários de dois indivíduos e muurolo-4,10-(14),dien-1- β -ol (23,09%) e δ -elemeno (11,16%) do terceiro indivíduo. Para o OE dos galhos foram observadas variações quali e quantitativas, sendo que no indivíduo 1 os majoritários foram 5-iso-cedranol (12,07%) e α -muurolol (11,28%), no indivíduo 2 α -bisabolol (13,19%) e 5-iso-cedranol (10,3%), enquanto que no indivíduo 3 predominou o α -muurolol (43,04%) (Brito, 2009).

Alguns estudos avaliando atividade biológica e farmacológica desta espécie tem sido conduzidos. Bero *et al.*(2009) avaliaram a atividade antimalárica de sete lignanas tetraidrofurânicas sendo que, dentre essas, o composto calopeptina demonstrou moderada atividade e não apresentou citotoxicidade.

Outro estudo avaliou a atividade leishmanicida e antimalárica do extrato hidroalcoólico das cascas de *N. megapotamica* e de substâncias isoladas. O extrato apresentou fraca atividade em ambos os casos, enquanto que, dos componentes isolados, os melhores resultados foram obtidos para as lignanas machilina G e veranguesina contra *Leishmania donovani* e da calopeptina contra *Plasmodium falciparum*. Também foram testados quanto à citotoxicidade frente a células Vero, não apresentando efeitos citotóxicos (Da Silva Filho *et al.*, 2008). Em estudo anterior do mesmo grupo, com extrato etanólico de folhas, observou-se atividade tripanocida para a machilina G, enquanto que o extrato bruto foi inativo (Da Silva Filho *et al.*, 2004a).

Experimentos testando o extrato hidroalcoólico das cascas e compostos isolados para avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória em ratos foram desenvolvidos. Nesse estudo, a substância isolada α -asarona foi a mais ativa no teste de constrição abdominal e os compostos galgravina e veraguensina apresentaram melhores resultados no ensaio de edema de pata (Da Silva Filho *et al.*, 2004b).

Testes de atividade antioxidante (ensaio com 2,2-difenil-picrilidrazila [DPPH] e β -caroteno) e antifúngica (microdiluição) foram realizados utilizando seis substâncias de estrutura aromática isoladas do extrato etanólico das cascas do caule de *N. megapotamica*. A (-)-epicatequina apresentou significativa atividade antioxidante em ambos os ensaios e as seis substâncias foram ativas frente às cepas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* (Garcez *et al.*, 2009). Atividade antioxidante também foi observada para os fenilpropanóides isolados do

extrato etanólico das cascas do caule (isoelemicina) e das folhas (2,6-dimetóxi-4[prop-1-enil]fenil-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo) de *N. megapotamica* no ensaio com β -caroteno (Miguita *et al.*, 2007).

O óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* apresentou forte e moderada atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Outros ensaios realizados no mesmo trabalho demonstraram atividade anti-inflamatória e antitumoral, com citotoxicidade seletiva para células de câncer de próstata e mieloma múltiplo para o OE (Apel *et al.*, 2006).

Em revisão bibliográfica de trabalhos com os sinônimos botânicos, foram encontrados artigos desta espécie como *Nectandra membranacea* (Sw.) Griseb. atualmente denominada *N. membranacea* (Spreng.) Hassl. Em um estudo com extrato acetônico da casca foi detectada atividade antitumoral, contra células HEP G2 e MDA-MB-231 (tumor de fígado e mama, respectivamente) e antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e hifas de *Candida albicans*. O OE das folhas também foi avaliado e não demonstrou atividade apreciável, tanto antitumoral quanto antimicrobiana (Wu *et al.*, 2006). Outro estudo, também utilizando o OE, mostrou uma forte atividade tóxica contra *Artemia salina*, porém da mesma forma que o trabalho anterior, não apresentou atividade antitumoral contra células HEP G2 (Werka *et al.*, 2007). Estudo com extrato hidroalcoólico das raízes de *N. membranacea* mostrou atividade antimalárica em ratos inoculados intraperitonealmente com *Plasmodium berghei* (Chinchilla-Carmona *et al.*, 2011).

2.2. Óleos essenciais

Óleos voláteis, também chamados de OEs, constituem-se de uma mistura complexa de substâncias voláteis, de viscosidade semelhante à dos óleos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. São produtos obtidos de matéria-prima vegetal através de destilação por arraste de vapor de água, bem como expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Quimicamente, a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, de acordo com a origem biossintética, sendo que os últimos preponderam. Os compostos terpênicos são constituídos de duas ou mais moléculas de isopreno, sendo mais frequentes nos óleos voláteis os monoterpenos (2 unidades de isopreno) e os sesquiterpenos (3 unidades de isopreno) e dentre estes, os monoterpenos são preponderantes. Os fenilpropanóides caracterizam-se por serem derivados benzênicos com

uma cadeia lateral de três átomos de carbono originados de ácidos aminados aromáticos que, por sua vez, se originam do ácido chiquímico (Bakkali *et al.*, 2008; De Araújo *et al.*, 2011) (Fig. 2).

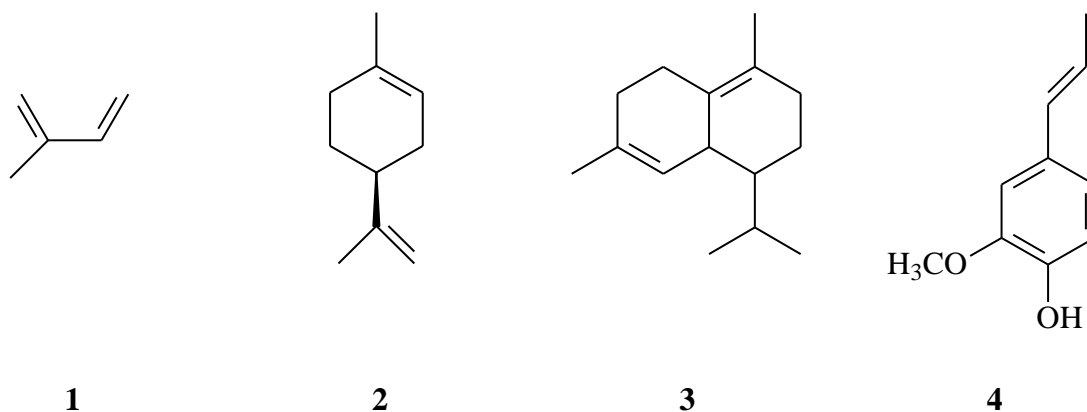


Figura 3 - Unidade de isopreno – C₅ (1), monoterpene – C₁₀ (2), sesquiterpene – C₁₅ (3) e fenilpropanóide (4). Adaptado de Baser e Buchbauer, 2010

As substâncias componentes dos óleos essenciais são, principalmente, derivadas de três vias biossintéticas, a via do mevalonato que forma os sesquiterpenos, a via do metileritritol (MEP), gerando mono- e diterpenos e a rota do ácido chiquímico, levando aos fenilpropanóides (Fig. 3). Deste modo, há um número quase incontável de substâncias individuais e uma enorme variação na composição química dos óleos voláteis (Baser e Buchbauer, 2010).

A composição química dos óleos voláteis é determinada por fatores exógenos (condições de cultivo) e por fatores endógenos (características genéticas, anatômicas e fisiológicas). A exposição por um longo período de tempo aos fatores exógenos pode afetar genes responsáveis pela produção dos voláteis e levar à existência de quimiotipos ou raças químicas dentro da mesma espécie. Além disso, o estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta também pode ser um fator determinante para a composição dos voláteis (Figueiredo *et al.*, 2008; Barra, 2009).

Plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em Angiospermas Dicotiledôneas, destacando-se as famílias *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae*. Dependendo da família, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), em tricomas glandulares (*Lamiaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae*) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*). Eles podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira), folhas (eucalipto), cascas dos caules

(canelas), madeira (pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma), frutos (erva-doce) ou sementes (noz-moscada) (Sangwan *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2008).

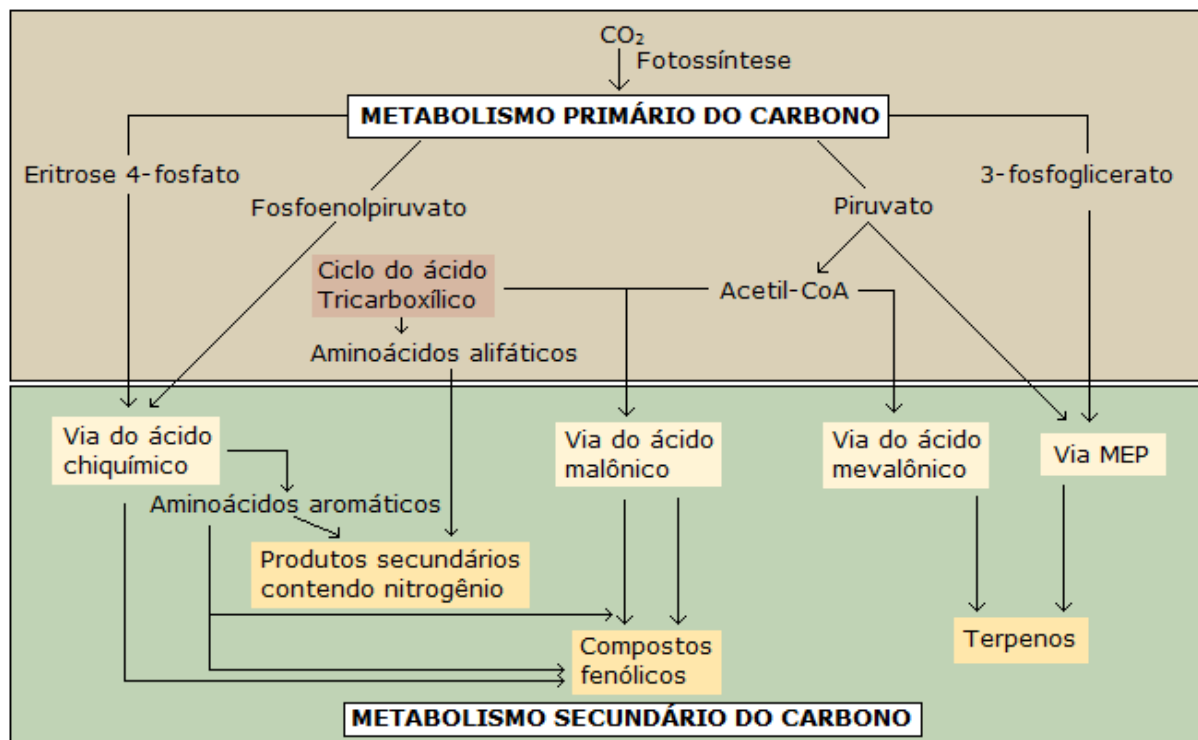


Figura 4 - Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários (Adaptado de Buchanan *et al.*, 2000); MEP = metileritritol

Várias técnicas podem ser utilizadas para extrair os OEs das diferentes partes das plantas aromáticas, dentre elas, hidrodestilação, arraste de vapor, extração com solventes, expressão ou prensagem, fluido supercrítico. A composição química dos OE irá diferir não só no número de moléculas, mas também na estereoquímica das moléculas extraídas, de acordo com o tipo de extração empregada e este, por sua vez, é escolhido de acordo com a finalidade de uso do OE obtido. Por exemplo, OEs para uso na indústria farmacêutica ou de alimentos são, preferencialmente, extraídos através de destilação por arraste de vapor ou expressão. Para perfumaria, a preferência é pela extração por solventes lipofílicos, enfloração ou dióxido de carbono supercrítico (Bakkali *et al.*, 2008). Em laboratório a técnica mais utilizada é a hidrodestilação, realizada com o auxílio de um aparelho do tipo Clevenger (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Na natureza os OEs desempenham um importante papel na proteção das plantas. Essas substâncias voláteis apresentam diversas funções ecológicas, podendo agir como mensageiros internos, como substâncias de defesa contra herbívoros e patógenos, como atratores de insetos

polinizadores e dispersores de sementes, agentes alelopáticos e, ainda, como hormônios de crescimento vegetal (Buchanan *et al.*, 2000).

Os OEs e seus constituintes têm sido amplamente utilizados por apresentarem inúmeras atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas: virucida, bactericida, fungicida, antiparasitária, anticancerígena, antioxidante, antidiabética, cardiovascular (Edris, 2007; Bakkali *et al.*, 2008). Atualmente, cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, principalmente para as indústrias farmacêuticas, de alimentos, agrônômicas, de cosméticos e perfumes. O óleo essencial como um todo ou alguns de seus componentes isolados são utilizados em perfumes, produtos de maquiagem, produtos odontológicos e sanitários, como aditivos e conservantes em alimentos e como medicamentos naturais (Bakkali *et al.*, 2008).

2.2.1. Óleos essenciais em espécies de Lauraceae

As espécies aromáticas de Lauraceae pertencem, principalmente, aos gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea* e *Licaria* e os óleos essenciais obtidos dessas espécies alcançam alto valor no mercado, pois são frequentemente usados como fonte de matéria-prima nas indústrias. Muitas espécies pertencentes à família Lauraceae estão entre as mais utilizadas pela indústria farmacêutica e de perfumes (Marques, 2001). Na família Lauraceae, o óleo essencial é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas nas folhas, na casca e no lenho (Metcalf, 1987 apud Marques, 2001).

As espécies do gênero *Aniba* Aubl. destacam-se pelo alto valor econômico, devido a constituição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca. O OE obtido da espécie *Aniba rosaeodora* Ducke, conhecida popularmente como pau-rosa e que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, é amplamente utilizado em fragrâncias e perfumes (Marques, 2001). Além disso, têm-se creditado ao linalol uma série de propriedades farmacológicas, incluindo anticonvulsivante, ansiolítica, antiinflamatória, antinociceptiva (Kamatou e Viljoen, 2008).

No gênero *Cinnamomum*, os mais importantes óleos voláteis são extraídos das espécies *C. zeylanicum* Blume, *C. cassia* (L.) C. Presl. e *C. camphora* (L.) Presl.. As cascas e folhas de *C. zeylanicum* são utilizadas como especiarias e para a produção de óleo essencial, sendo os constituintes majoritários, respectivamente, aldeído cinâmico e eugenol. Para esses OEs foram relatadas atividades antioxidantes, antimicrobianas e antidiabéticas (Jayaprakasha e Rao, 2011).

Cinnamomum camphora (L.) Presl. e *Lindera benzoin* (L.) Blume são reconhecidas como algumas das principais espécies produtoras de óleos essenciais da família. Da espécie *C. camphora* extrai-se a cânfora, que é muito utilizada em perfumaria e medicamentos pelo seu conteúdo em linalol. Da espécie *L. benzoin* (L.) se extrai o óleo de benjoin (Marques, 2001). Estudo realizado com o OE de *Lindera neesiana* Kurz mostrou significativa atividade antimicrobiana (Comai *et al.*, 2010) e atividade antibacteriana e citotóxica foi observada para *Lindera strychnifolia* (Yan *et al.*, 2009).

A partir das folhas de *Laurus nobilis* L. extrai-se um OE rico em 1,8-cineol, que é utilizado como antirreumático, antisséptico, diaforético, digestivo e diurético. Além disso, também é utilizado como componente em fragrâncias e na indústria de cosméticos e alimentos (Marques, 2001). Testes têm mostrado atividade antibacteriana (Baratta *et al.*, 1998), anticonvulsivante (Sayyah *et al.*, 2002), analgésica e antiinflamatória (Sayyah *et al.*, 2003) antifúngica (Simic *et al.*, 2004) e acaricida (Macchioni *et al.*, 2006) para este óleo.

Segundo Marques *et al.* (2001), dentro da família Laureaceae o gênero *Ocotea* é o que apresenta o maior número de espécies utilizadas na medicina popular. Da espécie *Ocotea pretiosa* extrai-se um óleo volátil rico em safrol, que é amplamente utilizado pela indústria cosmética e que também apresenta comprovada atividade contra ancilostomídeos em humanos. Os OEs obtidos deste gênero apresentam uma variedade de atividades biológicas: moluscicida (Coutinho *et al.*, 2007), antitrombótica (Ballabeni *et al.*, 2007), antioxidante, antifúngica e antibacteriana (Bruni *et al.*, 2004) bem como antitripanossômica (Setzer *et al.*, 2007).

Da espécie *Sassafras albidum* (Nutt.) Nees, árvore típica da América do Norte, extrai-se um OE rico em safrol, muito utilizado como aromatizante na indústria de bebidas e como matéria-prima para a síntese de outras moléculas em indústrias químicas (Marques, 2001). Estudo de Smic *et al.* (2004) relatou moderada atividade antifúngica para este OE.

A atividade biológica dos OEs do gênero *Nectandra* é pouco estudada. Na literatura são reportados estudos sobre atividade citotóxica contra células tumorais do OE de *N. membranaceae* (Sw.) Griseb. (Werka *et al.*, 2007), *N. salicina* (Ciccio *et al.*, 2009) e *N. megapotamica* que também apresentou atividade antiinflamatória (Apel *et al.*, 2006).

2.3. Anestesia em peixes

Em aquicultura e trabalhos experimentais com peixes, os mesmos estão sujeitos a uma série de procedimentos como pesagem, marcação, transporte, além de outras manipulações,

que podem gerar estresse nos animais. A anestesia pode ser utilizada para minimizar o estresse físico ou danos causados por alta densidade de estocagem, captura, manuseio, entre outros. Além disso, em trabalhos de pesquisa ou na prática veterinária, pode haver a necessidade de tornar os animais inconscientes ou mesmo aliviar a dor, sem interferir com os processos fisiológicos (Ross e Ross, 2008).

As respostas fisiológicas relacionadas ao estresse são agrupadas em primárias, que envolvem uma resposta neuroendócrina inicial, a qual inclui a liberação de catecolaminas a partir das células cromafins e a estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), culminando na liberação de hormônios corticosteróides na circulação sanguínea. As respostas secundárias, por sua vez, incluem alterações no metabolismo, equilíbrio hidromineral e nas funções cardiovascular, respiratória e imunológica. Algumas vezes, as respostas endócrinas são diretamente responsáveis pelas reações secundárias, resultando em alterações nos níveis plasmáticos e teciduais de íons e metabólitos. Respostas terciárias, que se relacionam ao desenvolvimento do animal como um todo, envolvem alterações no crescimento, comportamento, resistência a doenças e sobrevivência (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002; Gomes *et al.*, 2003).

Para a comercialização de peixes, o transporte de alevinos e juvenis é uma das etapas mais importantes e, durante este procedimento, os peixes são submetidos a situações estressantes como captura, superpopulação, manuseio, variações de temperatura e barulho excessivo (Oliveira *et al.*, 2009). O uso de anestésicos durante o processo de transporte tem como principal função, principalmente, minimizar a hipermotilidade dos peixes, que é causadora de injúrias (Gimbo *et al.*, 2008). Além disso, cuidados com a qualidade da água de transporte também devem ser observados, uma vez que sua deterioração irá afetar a homeostase dos animais transportados, levando-os à mortalidade durante e após o transporte (Ross e Ross, 2008).

Os animais, quando em contato com um anestésico, passam por diferentes estágios até chegar à anestesia propriamente dita. Segundo Stoskopf (1993), observam-se as seguintes etapas durante a indução à anestesia: (i) leve perda de reatividade a estímulos táteis e visuais; (ii) perda parcial do equilíbrio; (iii) perda total do equilíbrio; (iv) redução de batimentos operculares; (v) mínimo movimento opercular. Para avaliar a recuperação, considera-se o restabelecimento do equilíbrio e retorno ao nado ativo.

Como cada agente anestésico exige uma concentração diferente para induzir o estágio anestésico desejado, faz-se necessário testar várias concentrações antes do tratamento definitivo, para não causar mortalidade dos animais expostos ao fármaco (Roubach e Gomes, 2001). Ainda, o conteúdo de gordura, a massa corporal, idade e sexo, espécie, bem como a

temperatura e o pH do meio influenciam na velocidade de indução e também na recuperação dos animais (Burka *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2011).

O anestésico considerado ideal apresenta uma série de características, quais sejam: rápida indução da sedação e anestesia, preferivelmente em menos de três minutos e acompanhada de mínima hiperatividade; fácil aplicação, não envolvendo procedimentos complexos; fácil manutenção dos animais no estágio anestésico desejado, fornecendo imobilização adequada e analgesia eficaz; eficácia em baixas concentrações e alto índice terapêutico; recuperação rápida, substancialmente completa dentro de cinco minutos em água limpa e livre de comportamentos indesejáveis, como ataxia; segurança para os operadores nas doses usuais, não sendo irritante nem carcinogênica (Ross e Ross, 2008).

Existem vários produtos químicos utilizados para anestésiar peixes para o manuseio, transporte e redução do trauma em procedimentos invasivos (Pirhonen e Schreck, 2003). O único anestésico aprovado para uso em peixes pela Food and Drug Administration (FDA) é o metanossulfonato de tricaína (MS-222), que não é produzido no Brasil e apresenta alto custo e dificuldade de aquisição (Roubach *et al.*, 2005). Além deste, o sulfato de quinaldina, a benzocaína e o fenoxietanol também são utilizados no Brasil, porém, apresentam alguns efeitos colaterais como perda de muco, irritação nas brânquias e olhos e a necessidade do uso de luvas pelos trabalhadores. Devido à problemática apresentada com o uso dos anestésicos sintéticos mais utilizados, o uso de produtos naturais, principalmente óleos essenciais, vem sendo estudado (Inoue *et al.*, 2003) (Tab. 2).

2.3.1. Anestésicos sintéticos mais utilizados

Metanossulfonato de tricaína, também conhecido como MS-222, é classificado como um anestésico local sintético do tipo éster e é comumente utilizado em indústria pesqueira (Sato *et al.*, 2000). É um pó cristalino branco, com grande solubilidade em água (Sigma, 2010). O principal modo de ação do MS-222 é pela supressão do sistema nervoso, através da qual a entrada de sódio no nervo é inibida, o que limita a excitabilidade da membrana da célula nervosa (Burka *et al.*, 1997). A indução à anestesia é rápida, podendo ocorrer em apenas 15 segundos e as concentrações variam de 20 a 350 mg L⁻¹, na dependência da espécie de peixe e do estágio anestésico desejado (Ross e Ross, 2008).

Tabela 2 - Alguns agentes anestésicos sintéticos e naturais e concentrações testadas para indução de anestesia profunda em diferentes espécies de peixes

Substância/ OE total	Concentração	Espécie de peixe	Referência
Mentol	100 mg L ⁻¹	<i>Colossoma macropomum</i>	Façanha e Gomes, 2005
	100 mg L ⁻¹	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
	250 mg L ⁻¹	<i>Oreochromis niloticus</i>	Simões e Gomes, 2009
Lippia alba	300 mg L ⁻¹	<i>Rhamdia quelen</i>	Cunha <i>et al.</i> , 2010a
Melaleuca alternifolia	300 µL L ⁻¹	<i>Cyprinus carpio</i>	Hajek, 2011
Eugenol	30 mg L ⁻¹	<i>Salmo solar</i>	Iversen <i>et al.</i> , 2003
	50 mg L ⁻¹	<i>Piaractus brachypomus</i>	Sladky <i>et al.</i> , 2001
	50 mg L ⁻¹	<i>Rhamdia quelen</i>	Cunha <i>et al.</i> , 2010b
	75 µL L ⁻¹	<i>Carassius auratus</i>	Abdolazizi <i>et al.</i> , 2011
Aqui-S™	30 mg L ⁻¹	<i>Salmo solar</i>	Iversen <i>et al.</i> , 2003
Benzocaína	30 mg L ⁻¹	<i>Salmo solar</i>	Iversen <i>et al.</i> , 2003
	100 mg L ⁻¹	<i>Astyanax altiparanae</i>	Gimbo <i>et al.</i> , 2008
	100 mg L ⁻¹	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Gonçalves <i>et al.</i> , 2008
Metomidato	2 mg L ⁻¹	<i>Salmo solar</i>	Iversen <i>et al.</i> , 2003
	4 mg L ⁻¹	<i>Pimephales promelas</i>	Palic <i>et al.</i> , 2006
MS-222	100 mg L ⁻¹	<i>Piaractus brachypomus</i>	Sladky <i>et al.</i> , 2001
	75 mg L ⁻¹	<i>Pimephales promelas</i>	Palic <i>et al.</i> , 2006

As limitações quanto ao uso do MS-222 em peixes para consumo humano incluem um período de 21 dias de espera antes do abate e está restrito às famílias Ictaluridae, Salmonidae, Esocidae e Percidae (FDA, 2006). Além disso, uma grande lista de efeitos adversos decorrentes do seu uso foi documentada, incluindo elevação do hematócrito, hiperglicemia, alterações nos níveis sanguíneos de eletrólitos, hormônios, colesterol, uréia e lactato (Carter *et al.*, 2011).

A benzocaína (éster etílico do ácido *para*-aminobenzóico) é um anestésico local, cujo potencial de ação é semelhante ao MS-222. No entanto esse anestésico é 250 vezes menos solúvel em água, deste modo, qualquer solução com benzocaína tem que ser solubilizada em etanol, acetona ou propilenoglicol (Burka *et al.*, 1997). Assim como o MS-222, são necessários 21 dias para depuração do anestésico nos peixes a serem comercializados para consumo humano (Kiessling *et al.*, 2009). Efeitos adversos também são relatados para o uso da benzocaína, como elevação dos níveis plasmáticos de glicose e cortisol (Carneiro e Urbinati, 2001; Gomes *et al.*, 2001).

Quinaldina é um líquido oleoso, de coloração marrom-amarelada e com limitada solubilidade em água, devendo ser previamente dissolvida em etanol ou acetona (Neiffer e

Stamper, 2009). Embora seja um anestésico eficaz, é um material desagradável de manusear devido ao seu odor, sendo também irritante para os olhos e a pele em humanos; também existem relatos de danos na córnea de salmonídeos após seu uso (Ross e Ross, 2008). O sulfato de quinaldina é um pó cristalino, de coloração branca a amarelo-pálida, com pouco odor e que é facilmente solúvel em água. Ele tem demonstrado ser um anestésico conveniente e seguro para uso em peixes, apresentando anestesia e recuperação mais rápidas do que com o uso de quinaldina (Bircan-Yildirim et al., 2010). É mais seguro para manipular que a quinaldina, mas é mais caro do que a mesma e que o MS-222 (Ross e Ross, 2008).

2-Fenoxietanol é um líquido transparente, oleoso, incolor ou amarelo claro, facilmente solúvel em água. A solução tem sido utilizada como anestésico tópico, sendo bactericida e fungicida, o que a torna útil durante cirurgias abdominais e laparotomia. Não apresenta grandes vantagens em comparação aos outros fármacos, mas é relativamente barato. Requer cuidado com o manuseio, pois é nocivo se ingerido, inalado ou absorvido pela pele e é um forte irritante para pele e olhos (Ross e Ross, 2008).

Metomidato é um agente hipnótico não barbitúrico; apresenta-se na forma de pó solúvel em água, que vem sendo amplamente explorado como anestésico em peixes. Tem demonstrado alta eficácia, alcançando indução da anestesia em 1-2 minutos, sem hiperatividade dos animais, e recuperação mais rápida que a com o MS-222 (Ross e Ross, 2008). Apresenta atividade analgésica questionável e somente deve ser utilizado em peixes que não servirão como alimento (Burka *et al.*, 1997).

2.3.2. Anestésicos de origem natural

O eugenol vem sendo utilizado como anestésico para peixes em diversos países, apresentando vantagens econômicas e aparentemente, sem toxicidade (Sladky *et al.*, 2001; Kildea *et al.*, 2004). Ele é obtido do óleo de cravo, que é extraído através da destilação das folhas e flores da árvore *Eugenia aromatica* (Myrtaceae), sendo seu componente majoritário (70 a 90%) (Keene *et al.*, 1998). É um líquido marrom escuro, com forte aroma e sabor. As utilizações tradicionais do óleo de cravo incluem o uso no atendimento odontológico, como antisséptico e analgésico; já em pesquisas científicas diferentes atividades têm sido relatadas, entre elas, bactericida, fungicida, inseticida e anestésica (Chaieb *et al.*, 2007). Diversos trabalhos têm mostrado o eugenol como um anestésico eficaz e seguro para diferentes espécies de peixes (Cho e Heath, 2000; Iversen *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2010b).

Devido ao efeito positivo relatado para o uso do eugenol como anestésico em espécies aquáticas, um novo composto foi desenvolvido na Nova Zelândia e denominado Aqui-S™. Este agente anestésico é composto por isoeugenol (50%), o qual é o composto ativo, e polissorbato 80, sendo que estes componentes são considerados seguros pelo FDA. Apesar de eficaz, seguro para peixes e humanos e de custo acessível, alguns trabalhadores consideram que a lenta indução da anestesia alcançada nas doses recomendadas (15-20 mg L⁻¹, indução em menos de 10 minutos) é um fator limitante em alguns procedimentos (Ross e Ross, 2008).

Em estudos de Simões e Gomes (2009), o mentol exerceu atividade anestésica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), no entanto, houve um aumento da glicose plasmática indicando estresse do animal, o que contraindica o seu uso para esta espécie. Para tambaqui (*Colossoma macropomum*), observou-se atividade sedativa (100 mg L⁻¹) e anestésica (150 mg L⁻¹) do mentol sem alteração fisiológica da glicose plasmática (Façanha e Gomes, 2005). O mentol é extraído do óleo essencial de plantas de espécies de *Mentha*, principalmente de *M. arvensis* L., popularmente conhecida como hortelã (Gonçalves *et al.*, 2008). Apresenta propriedades anestésicas, anti-espasmódicas, anti-inflamatórias, antiúlcera e antivirais, sendo de grande importância para a indústria farmacêutica (Hajlaoui *et al.*, 2009).

Cunha *et al.* (2010a) demonstraram que o OE de *Lippia alba* foi capaz de induzir sedação leve (5-20 mg L⁻¹) e anestesia profunda (100-500 mg L⁻¹) em jundiás (*Rhamdia quelen*). Além disso, utilizado na concentração de 300 mg L⁻¹, este óleo inibiu a elevação de cortisol plasmático decorrente do manuseio dos animais e não afetou o odor e sabor dos filés.

Efeito sedativo e anestésico também foi observado para diferentes concentrações do OE de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) em carpa comum, sendo a concentração de 500 mg L⁻¹ considerada a ideal (indução e recuperação em menos de 3 e 10 minutos, respectivamente). No entanto, exposição prolongada (superior a 30 minutos) a este óleo provocou mortalidade nos animais (Hajek, 2011).

2.4. *Centropomus parallelus* (POEY)

O robalo-peva (Fig 4) pertence à família Centropomidae, sendo encontrado no Oceano Atlântico a partir do sul da Flórida (EUA) até Santa Catarina (Brasil) (Rivas, 1986). Esta é uma das duas espécies de robalos mais encontradas nas baías, lagoas costeiras e rios da América do Sul (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2002). As doze espécies do gênero *Centropomus* formam um grupo compacto, homogêneo e muito distinto dos outros dois gêneros da família.

Todos possuem corpos similares com formas finas, cores prateadas uniformes e uma conspícua linha lateral escura (Rivas, 1986).

As espécies do gênero *Centropomus* são estenotérmicas e termófilas, habitando regiões tropicais e subtropicais que atingem naturalmente temperaturas entre 15 e 24°C (Rivas, 1986). Segundo Barroso *et al.* (2002), os robalos (*Centropomus* spp.) têm sido reconhecidos como espécies com grande potencial para a aquicultura, devido a sua resistência a adversidades e ao seu valor comercial. Além disso, eles se adaptam bem ao cativeiro e à alimentação à base de ração.



Figura 5 – Fotografia do Robalo-peva (*C. parallelus*). Fonte: Fish Base

O robalo-peva pode atingir até 75 cm de comprimento total e peso em torno de 4 kg. No Brasil a produção é variável, sendo que a pesca comercial chega a 3.000 toneladas por ano. Devido à baixa produção, o preço no mercado pode atingir no mínimo a marca dos cinco dólares americanos o quilograma (Cerqueira e Tsuzuki, 2009). Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization) em 2008 a produção pesqueira de *Centropomus* spp. atingiu 3.950 toneladas no Brasil. Apesar da excepcional capacidade biológica e potencial econômico, são escassos os incentivos à pesquisa do desenvolvimento do seu cultivo. Os poucos estudos realizados são relativos, principalmente, à fase inicial do ciclo de vida do robalo (Temple *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial anestésico do óleo essencial de *N. megapotamica* para utilização como anestésico em peixes.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial anestésico do OE de folhas jovens e velhas de *N. megapotamica* em peixes da espécie *C. parallelus*, através da observação dos tempos de indução e recuperação da anestesia.

- Avaliar o efeito do OE sobre parâmetros bioquímicos e osmorregulatórios relacionados ao estresse causado pelo manuseio e transporte.

- Caracterizar a composição química dos OEs obtidos das folhas jovens e velhas de *N. megapotamica*.

4. MANUSCRITO

Os resultados que compõem esta dissertação estão apresentados sob a forma de Manuscrito, o qual está organizado nas seções Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O manuscrito está formatado segundo as normas exigidas pela Revista Científica à qual foi submetido (Aquaculture, ISSN 0044-8486).

Title: Anesthetic effect of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez essential oil on the handling and transport of fat snook *Centropomus parallelus*

Running title: Anesthetic effect of *Nectandra megapotamica* essential oil

Authors: Juliana Simoni Moraes Tondolo,^{1,6} Lúcio de Paula Amaral,² Larissa Novaes Simões,³ Quelen Garlet¹, Bianca Schindler², Teodoro Martins Oliveira¹, Bruno Ferreira da Silva³, Levy de Carvalho Gomes,³ Bernardo Baldisserotto⁴, Carlos Augusto Mallmann⁵, Berta Maria Heinzmann^{1,6*}

¹Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

³Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, Universidade de Vila Velha, Vila Velha – ES, Brazil

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

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

⁶Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Address for correspondence:

Berta M. Heinzmann

Campus UFSM, Prédio 44, sala 5015, 97105-900 Santa Maria – RS, Brazil. Tel.: +55-55-3220-9674 Fax: +55-55-3220-8248. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com

Abstract

This study analyzed the anesthetic potential of the essential oil (EO) of *Nectandra megapotamica* in fat snook (*Centropomus parallelus*) by the evaluation of the induction and recovery time of anesthesia and the stress response from handling and transport. For the extraction of EO, the leaves were separated in young (EO-Y) or old (EO-O). In the first experiment, four different concentrations of each EO were tested in fat snook acclimated to two salinities (zero and 33) to evaluate anesthesia induction and recovery time. In the second

experiment, two concentrations of EO-O were tested in fish acclimated to both salinities for the evaluation of stress parameters (glucose, lactate, Na^+ and K^+ plasma levels) caused by handling. In the third experiment, the fish were transported in plastic bags, supplied with both water salinities and two concentrations of EO-O for evaluation of water quality and mortality. In addition, the chemical composition of the essential oil was determined by CG/MS. Mild sedation was achieved at $30 \mu\text{L L}^{-1}$ and deep anesthesia at $150 \mu\text{L L}^{-1}$ with both EO. The EO-O was not able to avoid the stress of handling, as evidenced by elevated glucose and lactate plasma levels observed in all groups, treatments, and controls. The treatments did not significantly change the plasma Na^+ and K^+ levels in the fish kept at both salinities. During transportation, the use of EO-O did not improve the water quality and post-transport mortality. On the contrary, the fish transported with the highest concentration of EO in seawater had significantly higher mortality than the other groups. The main constituents of the Y and O-EOs were: bicyclogermacrene (46.5/34.6%), α -pinene (26.8/26.2%), β -pinene (7.9/12.3%), and germacrene D (9.6/9.1%). In conclusion, the EO of *N. megapotamica* has anesthetic activity in fat snook, but is not able to prevent the stress of handling and transport.

Keywords: anesthesia, sedation, stress, terpenoids

1. Introduction

Anesthetics are used in modern aquaculture management to minimize stress or physical damage caused by the handling, transport, and more invasive procedures that can cause poor performance, immunosuppression, and increased mortality in fish (Brown, 1988; Gray et al., 2011; Maule et al., 1989). The choice of anesthetic requires the consideration of availability, cost-effectiveness, nature of experiment and uses, species of the fish and the safety/toxicity to fish, humans, and environment (Cho and Heath, 2000). A variety of agents, such as tricaine methanesulphonate (MS-222), 2-phenoxyethanol, quinaldine, benzocaine, and metomidate, have been used as anesthetic agents in fish. However, the use of several of these compounds has been limited or rejected once they have unwanted side effects for fish and humans (Gilderhus and Marking, 1987; Palic et al., 2006). Alternatively, several studies using plant derivative compounds, such as essential oils from *Eugenia*, *Mentha*, and *Lippia* species, have demonstrated that these natural products are effective for fish sedation and may have benefits over traditional methods, including low cost and safety (Cunha et al., 2010a; Gonçalves et al., 2008; Iversen, 2003; Palic et al., 2006; Velisek et al., 2011).

The genus *Nectandra* Rol. ex Rottb (Lauraceae) includes more than 100 recognized species of canopy trees mainly distributed from the Amazon to South Brazil, Argentina, Paraguay, and Uruguay (Alves and Sartori, 2009; Zanon et al., 2009). *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez is used in folk medicine as anti-rheumatic, analgesic (Santos Filho and Gilbert, 1975), and sedative (Alves et al., 2008). Previous pharmacological investigation showed analgesic and anti-inflammatory activities for the hydroalcoholic extract of this species (da Silva et al., 2004). Additionally, the ethanolic extract presented antioxidant and antimicrobial activities (Garcez et al., 2009) while, for the essential oil, the literature describes anti-inflammatory and antitumor activities (Apel et al., 2006).

The snooks (*Centropomus* spp) have been recognized as a genus with great potential for aquaculture due to its resistance to adversity, good growth rate, and its market value (Barroso et al., 2002). In the process of production, the transport of fingerlings and juveniles is one of the most important steps in the management and marketing of fish. This practice inevitably involves stress and may cause large-scale mortality and a loss in product quality. Several studies have shown the positive effect of anesthetics during the transport of many fish species (Inoue et al., 2005; Iversen et al., 2009; Pramod et al., 2010).

The objectives of the present study were to determine the anesthetic potential of the essential oil of *N. megapotamica* by evaluating the induction and recovery times from anesthesia and the effect on biochemical and osmoregulatory parameters related to the stress of handling and transport in fat snook, *Centropomus parallelus*. In addition, the chemical composition of the essential oil was determined in order to discuss the possible substances that are responsible for the detected activity.

2. Materials and methods

2.1. Experimental fish

Fat snook juveniles were purchased from Pandini Fish Culture (São Mateus, ES, Brazil) and transported to the Laboratory of Fish Culture at the Universidade Federal do Espírito Santo (UFES – Aracruz), where they were acclimated to salinity zero (freshwater) or 33 (seawater salinity in the tanks where fish were raised) for 10 days. They were kept in continuously aerated tanks of 500 L (small fish) and 1000 L (large fish) and fed commercial pellets NRD 1.2 (Inve[®]) three times a day and fasted 24 h before the experiments. Data on water quality parameters [salinity zero/salinity 33] were: conductivity (mS), 0.183–5.3 / 49.6–

55.2; salinity (ppt), 0/33.1–35.2; temperature (°C), 23.1–25.1/24.2–27; dissolved oxygen (mg L⁻¹), 7.62–7.87/7.15–7.62. Data were measured using a YSI 85 multiparameter instrument.

2.2. *Plant material*

Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez was collected from the native forests of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. The aerial parts of the plant were collected in November 2010 and identified by Prof. Dr. Solon Jonas Longhi, Department of Forestry Engineering, UFSM. A voucher specimen (SMDB n° 13.107) was deposited in the herbarium of the Department of Biology, UFSM.

2.3. *Essential oil extraction*

The leaves were classified into young (sample Y) and old (sample O) by researchers from forestry engineering in accordance with the methodology adapted from Penfold and Willis (1961), considering the arrangement of leaves on the branches, with nodes and internodes about different cycles of tree growth as the control. For classification into Y and O, the size, texture, color, and particle deposition on the upper surface of the sheet were also considered. The Y and O leaves were submitted separately to hydrodistillation extraction in a Clevenger apparatus for 3 h. In this method, the distillate is collected in a graduate glass tube and the aqueous phase is automatically reused into the distillation flask (European Pharmacopoeia, 2007). The essential oil from the young leaves (EO-Y) and old leaves (EO-O) were stored at -4°C in amber glass bottles.

2.4. *Volatile oil analysis and identification of constituents*

The EOs were analyzed by GC/MS, using an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 mass selective detector operating at 70 eV. The analyses were performed using a HP-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), injecting 1.0 µL of a solution at 1.0 µL mL⁻¹ of EO in hexane in splitless mode. The carrier gas flow rate (He) was 1.3 mL min⁻¹, and the injector and detector temperatures were set at 250 and 320°C, respectively. The oven temperature was programmed from 40-320°C at 4°C min⁻¹. The identification of the individual EO components was accomplished by the comparison of the Kovats retention index with the data in the literature and by matching the mass spectral data with those available in the system (Adams, 2001; NIST, 2002). For

quantitative analysis, the percentage composition of the EO samples was computed by integrating the peak area of the chromatograms.

2.5. Anesthesia induction and recovery

Fingerlings (0.49 ± 0.03 g and 3.65 ± 0.08 cm) were transferred to glass aquaria that contained 100 mL of fresh- or seawater and the EOs (Y or O) of *N. megapotamica* at concentrations of 30, 150, 300, and $450 \mu\text{L L}^{-1}$ (equivalent to 24, 120, 240, and 360 mg L^{-1} , respectively, because the density of this EO is approximately 0.80), first diluted in ethanol (1:10). Control experiments were performed using aquaria that only contained ethanol at concentrations that were equivalent to the dilutions used for 300 and $450 \mu\text{L L}^{-1}$ EO (2700 and $4050 \mu\text{L L}^{-1}$). To evaluate the time required for anesthesia induction, eight fingerlings were used for each concentration tested, and each fingerling was used only once, according to the method of Stoskopf (1993). The observation time was 10 min and at the end of this period the juveniles were transferred to anesthetic-free aquaria to measure the anesthesia recovery time.

2.6. Biochemical and osmoregulatory parameters

Juveniles (37.2 ± 4.03 g and 28.7 ± 3.77 g, for fresh- and seawater adapted fish, respectively; $n=6$ for group) were anesthetized with 30 and $300 \mu\text{L L}^{-1}$ EO-O of *N. megapotamica* first diluted in ethanol (1:10) in aquaria containing 1 L of fresh- or seawater. Fish taken directly from the main tank (fresh- or seawater) were considered as the basal control (BC); fish kept in anesthetic-free aquaria for 10 min (simulating anesthesia procedure) were considered aquarium control (AC). After anesthesia, blood was collected from the caudal vein and the glucose levels were determined with the digital Accu-Chek Active (Roche™). The remaining blood was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and then frozen for future analysis. Plasma Na^+ and K^+ levels were determined with a flame photometer Analyser 910 (Analyser, São Paulo, Brazil) and the plasma lactate levels through a biochemical kit (Bioclin, K084) performed in automatic spectrophotometer Bioplus. Immediately after blood collection, the fish were euthanized by cervical section to remove the gills and muscle for tissue hydration determination. After weighing the tissues (wet weight), they were dried for 24 h at 60°C and then weighed again (dry weight). The loss in weight (water) was expressed as a percentage of the initial wet weight of the sample.

2.7. Transportation experiment

Fish were removed from the acclimation tanks and placed in 4 L polyethylene bags with 1 L of fresh- or seawater and load density of 10 fish L⁻¹ (16.76±0.59 g L⁻¹) for freshwater and 25 fish L⁻¹ (11.16±0.24 g L⁻¹) for seawater. The EO-O of *N. megapotamica*, first diluted in ethanol (1:10), was added to plastic bags at 15 or 30 µL L⁻¹. The control groups only used water or ethanol at the same concentration that was used for the dilution of 30 µL L⁻¹ of EO. The bags were inflated with pure oxygen and then sealed. The experiment was performed in triplicate. The transport was carried out on paved and unpaved roads for 10 h. Water quality parameters (temperature, pH, conductivity, oxygen, and ammonia) were analyzed before and after transport and mortality was observed at times zero (arrival), 12, 60, and 84 h after transport. Total ammonia was determined by the indophenol blue method (American Public Health Association, 1998) and other parameters as previously described in section 2.1. Ammonia excretion was calculated according to Gonzales et al. (1998).

2.8. Statistical analyses

All the data are represented as mean ± SEM and were subjected to Levene's test to check the homogeneity of variances. Data from the time of anesthesia induction and recovery were subjected to logarithmic transformation to obtain homogeneity between groups and two-way ANOVA followed by the Tukey's test were performed to test for the difference between groups. Data expressed in percentages (mortality) were subjected to arcsine transformation and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's test. The relationship between the anesthetic concentration and time to reach each anesthetic stage or recovery were assessed using Sigma Plot 11.0 software. A significant difference was established at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Anesthesia induction and recovery

The increasing concentration of EOs proportionally decreased the time required for sedation and anesthesia induction in most stages, but increased recovery time (Table 1). All the fish recovered from anesthesia within 30 minutes and no mortality was registered in the course of the experiment. For anesthesia induction, 30 µL L⁻¹ EO-O was effective in inducing stages 1-4, but stages 3 and 4 in freshwater and stage 4 in seawater were only reached by 25, 37.5, and 25% of the fish, respectively. Fat snooks acclimated to the seawater and when exposed to the same concentration of EO-Y they did not reach stage 3 and the fish recovered

before the end of the exposure to this EO. From the 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y, all the fish reached stage 4 (reduced opercular movement) and minimal opercular movement (stage 5) was reached only by fish exposed to 450 $\mu\text{L L}^{-1}$, in both types of water (Fig. 1).

There was no significant difference in the time to reach the different stages of anesthesia in freshwater-adapted fat snook exposed to 30 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y and EO-O. The induction times to stage 3 at 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y and stage 1 at 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y were significantly higher than those using EO-O at the same concentrations in freshwater. The tests in seawater showed no significant difference between the induction time for the different stages with EO-Y or EO-O at 30 $\mu\text{L L}^{-1}$, while the time to reach stage 1 at 150, 300, and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y and the time to reach stage 2 at 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y was significantly faster than using EO-O. The induction time to stage 3 was significantly greater at 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y than with EO-O in seawater. The recovery time was significantly lower at 150 and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y in seawater and at 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y in freshwater (Fig. 1).

The time to reach the different anesthesia stages at 30 and 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y was not affected by fresh or seawater adaptation. In freshwater, the induction times to reach stage 3 were significantly lower than in seawater at 300 and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y, but the time to reach stage 1 at 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y had a significantly greater induction time. Fat snooks exposed to 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-O presented significantly faster induction times to stages 1, 2, and 3 in freshwater than in seawater. The recovery time was significantly lower at 150, 300 and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-O and at 300 and 450 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-Y in freshwater than in seawater. All fish (fresh- or seawater adapted) exposed to 2700 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethanol alone reached stage 1 within 30 s, but 87.5% showed full recovery even in ethanol after 2 min. Fat snooks exposed to 4050 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethanol reached stage 1 within 10 s. Half of the fish reached stage 3 in 20 s, but after 2 min only 25% of the total remained in this stage up to the end of the observation (10 min). Recovery was immediate in aquaria containing water only.

3.2. *Biochemical and osmoregulatory parameters*

Fish subjected to the simulation of anesthesia (AC) and exposed to 30 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-O in seawater showed significantly higher plasma glucose and lactate levels compared to the basal control (BC), but did not differ between them. Both parameters were significantly highest in freshwater-adapted fat snooks anesthetized with 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-O. The plasma glucose levels were significantly higher in seawater fish subjected to AC and exposed to 30 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ EO-O than in freshwater fish subjected to the same treatments. Seawater-

adapted fat snooks subjected to AC also presented significantly higher lactate levels than freshwater ones submitted to the same treatment (Fig. 2A and 2B).

The treatments did not change the plasma Na^+ and K^+ levels significantly in fish kept at both salinities. Plasma Na^+ levels of fish from BC, AC, and $30 \mu\text{L L}^{-1}$ groups maintained in seawater were significantly higher than those of the same groups kept in freshwater. No significant differences were observed for the plasma K^+ levels between fat snooks from both salinities (Fig. 2C and D). The overall muscle and gill water content was $\sim 80\%$ and $68\text{-}74\%$, respectively, for all groups and was not affected significantly by treatments or salinity (Table 2).

3.3. Transportation experiment

Following 10 h transportation, in freshwater-acclimated groups there was no death on arrival. Post-transported mortality was low up to the end of 84h and showed no significant difference between groups (Fig 3A). In seawater-acclimated fat snooks mortality ranged from 2.6-12.0% and increase up to 12h, differing statistically from arrival. Post-transport mortality was significantly highest in fish transported with $30 \mu\text{L L}^{-1}$ EO-O (Fig. 3B). Water quality parameters at the end of transportation and ammonia excretion did not show any statistical differences between the treatments for both water types. Water temperature, conductivity, and pH at the end of transportation also did not present any statistical differences compared with water before transportation ($24/29^\circ\text{C}$, $0.134/52.7 \text{ mS}$, $7.04/7.64$, respectively for fresh-/seawater). The dissolved oxygen level before transportation was $7.75/7.77 \text{ mg L}^{-1}$ for fresh-/seawater, respectively, and at the end of the transportation was supersaturated (higher than 200%) for all groups in both salinities. Total ammonia levels increased significantly for all groups at the end transportation compared to before transport ($0.03/0.04 \text{ mg L}^{-1}$ fresh-/seawater) (Table 3).

3.4. Volatile oil analysis and identification of constituents

A total of 23 and 21 compounds were identified in the EO-Y and EO-O, accounting for 99.86 - 99.81% of their total composition, respectively. These EOs of *N. megapotamica* were largely composed of monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons. The main constituents of the Y and O-EOs were: bicyclogermacrene (46.5/34.6%), α -pinene (26.8/26.2%), β -pinene (7.9/12.3%), germacrene D (9.6/9.1%) and limonene (2.3/4.6%) (Table 4).

4. Discussion

The concentration of both EOs of *N. megapotamica* that is required to induce mild sedation in fat snook adapted to both salinities is $30 \mu\text{L L}^{-1}$. At concentrations of $150 \mu\text{L L}^{-1}$ or higher, the induction of deep anesthesia (stage 4) was achieved in 5.6–8.0 min. The recovery time of anesthesia induced for this concentration varied between 5.5–11.0 min. Studies with the EOs of different plant species have shown variations in efficacy and safety, depending on the chemical composition and the fish species tested. Menthol, the main component of the EO of plants from genus *Mentha*, can induce deep anesthesia in *Colossoma macropomum* at 100 mg L^{-1} in 4.39 min, whereas recovery occurred in 5.04 min (Façanha and Gomes, 2005) and for the same concentration in *Piaractus mesopotamicus* the induction and recovery time were less than 2 min (Gonçalves et al., 2008). The EO of *Lippia alba* was effective to induce stage 4 in silver catfish (*Rhamdia quelen*) at 300 mg L^{-1} in 3.8 min and recovery in 6.4 min (Cunha et al., 2010a). The same stage of anesthesia was achieved in 3.8 min and recovery in 6.0 min using $300 \mu\text{L L}^{-1}$ of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) in common carp, *Cyprinus carpio* (Hajek, 2011). The effect of eugenol (major component of clove oil), varies according to the species of fish, but $30\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$ induced deep anesthesia within 2-8 min in red pacu, *Piaractus brachipomus* (Sladky et al., 2001), matrinxã, *Brycon amazonicus* (Inoue et al., 2003), Atlantic salmon, *Salmo solar* (Iversen, 2003), silver catfish, *Rhamdia quelen* (Cunha et al., 2010b) and goldfish, *Carassius auratus* (Abdolazizi et al., 2011). The recovery time range was 1-10 min.

The efficacy of anesthetic agents can be affected by biological (species, age, size and sex) and environmental (salinity, pH, oxygen level, and water temperature) factors (Ross and Ross, 2008). In this study, we compare the anesthetic activity of EO of *N. megapotamica* at different salinities through the times of induction and recovery of anesthesia and, in general terms, there was a shorter induction and recovery times in freshwater adapted fat snook. Ghazilou et al. (2010) observed that Caspian salmon (*Salmo trutta caspius* K.) exposed to clove oil at different salinity levels showed an increase in induction time with increasing salinity. According Ross & Ross (2008), due to the buffering capacity of seawater and its ionic constituents the effects of some drugs may be modified in seawater, even in the same species.

Analysis of the major constituents of the EO-Y and EO-O of *N. megapotamica* indicated almost the same qualitative composition. Both EO presented bicyclogermacrene, α -

and β -pinene and germacrene D as the major compounds, but the concentration of the substances varies according to the development stage of the leaves. For the EO of the same species growing in São Paulo state (Brazil), the literature describes α -bisabolol as a major constituent (Romoff et al., 2010). Different factors affect the chemical composition of EO, such as exogenous (cultivation conditions) and endogenous factors (genetical, anatomical, and physiological characteristics). The exogenous factors, over a long period, might affect some of the genes responsible for volatiles formation and lead to ecotypes or chemotypes in the same plant species (Barra, 2009; Figueiredo et al., 2008).

The major compounds can play an important role in the observed pharmacological effect. Both α - and β -pinene have been reported as sedatives (Mercier et al., 2009) and analgesics (Erazo et al., 2006). Kasanen et al. (1998) also reported that all pinenes induced sedation followed by signs of anesthesia in mice. Moreover, α -pinene is reported as a positive modulator of GABA_A receptors (Aoshima and Hamamoto, 1999). These receptors are recognized as important targets for modulation by sedative, anxiolytic, and general anesthetic agents (Franks and Lieb, 1994). Del-Vechio-Vieira et al. (2009) described the analgesic activity of EO from the leaves of *Ageratum fastigiatum* in mice, whose main component was germacrene D. Studies regarding this activity related to bicyclogermacrene were not found.

Anesthetic agents are widely used in aquaculture for minimizing stress and to prevent the possibility of physical injuries during husbandry practices (Iversen et al., 2009). Some anesthetics can inhibit stress by acting on the hypothalamo-pituitary-interrenal (HPI) axis reducing or blocking its activity. Failure to suppress the activation of the HPI axis during stress results in the rapid release of catecholamines and consequent increase in circulating levels of glucose and lactate (Barton, 2002; Rotllant et al., 2001).

The results observed in the present study showed that the EO-O of *N. megapotamica* did not minimize the effects of handling in seawater-adapted fat snooks. In addition, in those maintained in freshwater, the exposure to the highest concentration tested of this EO apparently induced stress because plasma glucose and lactate levels were significantly higher than in fish from other treatments. Elevated levels of glucose were also observed after the induction of anesthesia with eugenol in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Holloway et al., 2004), common carp (Velisek et al., 2005), and rock bream, *Oplegnathus fasciatus* (Park et al., 2009). The same occurred with eugenol and MS-222 in red pacu and it was hypothesized that, similarly to what occurs in mammals, this increase of glucose levels was due to catecholamine-induced gluconeogenesis (Sladky et al., 2001). Rise of the plasma lactate concentration was also reported with the use of eugenol in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

(Deriggi et al., 2006). Increase of plasma glucose and lactate levels in common dentex (*Dentex dentex*) as consequence of handling, resulted of hepatic glycogen catabolism and muscle glycogen hydrolysis, respectively (Morales et al., 2005).

Among the secondary responses to stress, osmoregulatory disturbances could be observed, as evidenced by changes in the water content of tissues and plasma ions. The muscle and gills water content can be used as a physiological index to evaluate the balance of the water content in fish (Lee et al., 2009). Our results showed no significant change in the water content of fat snook muscle and gills as well as the Na⁺ and K⁺ plasma levels between the anesthetized fish and the controls in the same salinity, but seawater-adapted fish showed higher Na⁺ plasma levels than freshwater-adapted fish. This was expected because the adaptation to freshwater or seawater can change the osmoregulatory parameters in some species. For example, seawater acclimation increased osmolality in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Fiess et al., 2007) and plasma Na⁺ and Cl⁻ in European flounder (*Platichthys flesus*) (Lundgreen et al., 2008) compared to freshwater-adapted specimens.

During the transportation process, fish are subjected to various stress factors, among them are handling, mechanical shock, noise, and poor water quality that may cause physiological changes and post-transport mortality. Control of water quality and fish sedation during transportation can be useful tools to minimize this problem (Ross and Ross, 2008). In the present study, the water quality at the end of transport was within the acceptable values for snooks (Alvarez-Lajonchere and Tsuzuki, 2008). However, EO-O did not reduce ammonia excretion, and consequently did not improve the water quality. In addition, mortality was not lower with the use of EO-O, on the contrary, fish transported with the highest concentration of EO in seawater had significantly higher mortality than the other groups.

5. Conclusion

The essential oil of *N. megapatomica* is effective at inducing mild sedation and deep anesthesia in *C. parallelus*. However, it does not prevent the stress caused by the handling and transport of fish and is not, therefore, an ideal anesthetic agent for use in fat snooks. Future studies aiming at the isolation of the substances with anesthetic potential and activity tests with different fish species will better elucidate the anesthetic activity of this essential oil.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, process 470964/2009-0 and process 559090/2009-9 and [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul](#)- FAPERGS- PRONEX process 10/0016-8). B. Baldisserotto, L.C. Gomes, and C.A. Mallmann received a CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, Brazil) and L.P. Amaral a CAPES ([Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior](#), Brazil) PhD fellowship. In addition, Q. Garlet received a FIT/UFSM (Fundo de Incentivo Tecnológico da UFSM), and B. Schindler and T.M. Oliveira a FIPE/UFSM (Fundo de Incentivo à Pesquisa da UFSM) fellowship. The authors thank Prof. Dr. Solon Jonas Longhi for the identification of the plant species.

References

- Abdolazizi, S., Ghaderi, E., Naghdi, N., Kamangar, B.B., 2011. Effects of clove oil as an anesthetic on some hematological parameters of *Carassius auratus*. J. Aquac. Res. Development. 02, doi:10.4172/2155-9546.100010.
- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Alvarez-Lajonchere, L., Tsuzuki, M.Y., 2008. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. Aquac. Res. 39, 684-700.
- Alves, E.O., Mota, J.H., Soares, T.S., Vieira, M.C., da Silva, C.B., 2008. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. Ciênc. agrotec. 32, 651-658.
- Alves, F.M., Sartori, A.L.B., 2009. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. Acta bot. bras. 23, 118-129.
- American Public Health Association., American Water Works Association., Water Pollution Control Federation., Water Environment Federation., 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 ed. American Public Health Association, New York.
- Aoshima, H., Hamamoto, K., 1999. Potentiation of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. Biosci. Biotech. Bioch. 63, 743-748.
- Apel, M.A., Lima, M.E.L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G., Suffredini, I.B., Moreno, P.R.H., 2006. Screening of the biological activity from

- essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). *Pharmacologyonline*. 3, 376-383.
- Barra, A., 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1147-1154.
- Barroso, M.V., Castro, J.C., Aoki, P.C.M., Helmer, J.L., 2002. Nutritive value for some ingredients for snook (*Centropomus parallelus*). *R. Bras. Zootec.* 31, 2157-2164.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol.* 42, 517-525.
- Brown, L.A., 1988. Anesthesia in fish. *Vet. Clin. N. Am-Small.* 18, 317-330.
- 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). *Aquac. Res.* 31, 537-546.
- Cunha, M.A., de Barros, F.M.C., de Oliveira Garcia, L., de Lima Veeck, A.P., Heinzmann, B.M., Loro, V.L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010a. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 306, 403-406.
- Cunha, M.A., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.O., Loro, V.L., Fonseca, M.B., Emanuelli, T., Veeck, A.P.L., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., 2010b. Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Cienc. Rural.* 40, 2107-2114.
- da Silva, A.A., Silva, M.L.A.E., Carvalho, J.C.T., Bastos, J.K., 2004. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1179-1184.
- Del-Vechio-Vieira, G., de Sousa, O.V., Miranda, M.A., Senna-Valle, L., Kaplan, M.A.C., 2009. Analgesic and anti-inflammatory properties of essential oil from *Ageratum fastigiatum*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 1115-1121.
- Deriggi, G.F., Inoue, L.A.K.A., Moraes, G., 2006. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Sci. Biol. Sci.* 28, 269-274.
- Erazo, S., Delporte, C., Negrete, R., Garcia, R., Zaldivar, M., Iturra, G., Caballero, E., Lopez, J.L., Backhouse, N., 2006. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *J. Ethnopharmacol.* 107, 395-400.
- European Pharmacopoeia, 2007. Strassbourger, European Directorate for the Quality of Medicine, 6th ed..

- Façanha, M.F., Gomes, L.C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amaz.* 35, 71-75.
- Fiess, J.C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L.G., Yancey, P.H., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 146, 252-264.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag. J.* 23, 213-226.
- Franks, N.P., Lieb, W.R., 1994. Molecular and cellular mechanisms of general-anesthesia. *Nature.* 367, 607-614.
- Garcez, F.R., Garcez, W.S., Hamerski, L., Miguita, C.H., 2009. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapota mica*. *Quim. Nova.* 32, 407-411.
- Ghazilou, A., Hasankandi, H.S., Chenary, F., Nateghi, A., Haghi, N., Sahraeean, M.R., 2010. The anesthetic efficiency of clove oil in caspian salmon, *Salmo trutta caspius* K., smolts in dosage-salinity-pH linked approach. *J. World Aquacult. Soc.* 41, 655-660.
- Gilderhus, P.A., Marking, L.L., 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *N. Am. J. Fish. Man.* 7, 288-292.
- Gonçalves, A.F.N., Santos, E.C.C., Fernandes, J.B.K., Takahashi, L.S., 2008. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Sci. Anim. Sci.* 30.
- Gonzalez, R.J., Wood, C.M., Wilson, R.W., Patrick, M.L., Bergman, H.L., Narahara, A., Val, A.L., 1998. Effects of water pH and calcium concentration on ion balance in fish of the Rio Negro, Amazon. *Physiol. Zool.* 71, 15-22.
- Gray, S.M., Hart, F.L., Tremblay, M.E.M., Lisney, T.J., Hawryshyn, C.W., 2011. The effects of handling time, ambient light, and anaesthetic method, on the standardized measurement of fish colouration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 68, 330-342.
- Hajek, G.J., 2011. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquac. Res.* 42, 296-300.
- Holloway, A.C., Keene, J.L., Noakes, D.G., Moccia, R.D., 2004. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquac. Res.* 35, 1025-1030.
- Inoue, L.A.K.A., dos Santos Neto, C., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Cienc. Rural.* 33, 943-947.

- Inoue, L.A.K.A., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., Moraes, G., 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amaz.* 35, 289-295.
- Iversen, M., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture.* 221, 549-566.
- Iversen, M., Eliassen, R.A., Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. *Aquac. Res.* 40, 233-241.
- Kasanen, J.P., Pasanen, A.L., Pasanen, P., Liesivuori, J., Kosma, V.M., Alarie, Y., 1998. Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. *Arch. Toxicol.* 72, 514-523.
- Lee, T.H., Tang, C.H., Tzeng, C.S., Hwang, L.Y., 2009. Constant Muscle Water Content and Renal HSP90 Expression Reflect Osmotic Homeostasis in Euryhaline Teleosts Acclimated to Different Environmental Salinities. *Zool. Stud.* 48, 435-441.
- Lundgreen, K., Küllerich, P., Tipsmark, C.K., Madsen, S.S., Jensen, F.B., 2008. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *J. Comp. Physiol. B.* 178, 909-915.
- Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L., Schreck, C.B., 1989. Stress alters immune function and disease resistance in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* 120, 135-142.
- Mercier, B., Prost, J., Prost, M., 2009. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha- and beta-pinenes): a review. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 22, 331-342.
- Morales, A.E., Cardenete, G., Abellan, E., Garcia-Rejon, L., 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* 36, 33-40.
- NIST, 2002. NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs NIST 02 update. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Palic, 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.

- Park, M.O., Im, S.Y., Seol, D.W., Park, I.S., 2009. Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. *Aquaculture*. 287, 427-430.
- Pramod, P.K., Ramachandran, A., Sajeevan, T.P., Thampy, S., Pai, S.S., 2010. Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). *Aquac. Res.* 41, 309-314.
- Romoff, P., Ferreira, M.J.P., Padilha, R., Toyama, D.O., Fávero, O.A., Lago, J.H.G., 2010. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). *Quim. Nova*. 33, 1119-1121.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed. Blackwell, Oxford ; Ames, Iowa.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Perez-Sanchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocr.* 121, 333-342.
- Santos Filho, D.D., Gilbert, B., 1975. Alkaloids of *Nectandra megapotamica*. *Phytochemistry*. 14, 821-822.
- 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 brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337-342.
- Stoskopf, M., 1993. Anaesthesia. in: Brown, L. (Ed.), *Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine*. Pergamon Veterinary Handbook Series, London, UK, pp. 161-168.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova, L., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Med-Czech.* 50, 269-275.
- Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*. 310, 369-375.
- Zanon, M.M.F., Goldenberg, R., de Moraes, P.L.R., 2009. The genus *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) in Parana State, Brazil. *Acta bot. bras.* 23, 22-35.

Table 1 - Regression equations relating the time required for the induction and recovery from anesthesia using the essential oils of *Nectandra megapotamica* in fat snook fingerlings. Stages according to Stoskospf (1993). Where y = time to reach the stage (s) and x = concentration of the essential oils ($\mu\text{L L}^{-1}$) - indicates that there is no significant relationship. N = 8 for each concentration tested. Stages of anesthesia: S1, slight loss of reactivity to visual and tactile stimuli; S2, partial loss of equilibrium; S3, total loss of equilibrium; S4, reduced opercular movement; S5, minimal opercular movement; REC, recovery of equilibrium and swimming actively.

Stages	Freshwater		Seawater	
	Essential oil-Y	Essential oil-O	Essential oil-Y	Essential oil-O
S1	-	$\ln y = 2.86 + 5.01^{-x}$ $r^2 = 0.769$	$\ln y = 3.27 - 0.04x^{0.5}$ $r^2 = 0.985$	-
S2	$\ln y = 4.46 - 0.002x$ $r^2 = 0.908$	$\ln y = 3.32 + 58.19/x$ $r^2 = 0.994$	$\ln y = 4.89 - 0.003x$ $r^2 = 0.969$	$\ln y = 4.87 - 0.003x$ $r^2 = 0.996$
S3	-	$\ln y = 5.93 - 167.8/x$ $r^2 = 0.999$	$\ln y = 5.65 + 5.2/x^{0.5}$ $r^2 = 0.999$	-
S4	-	-	-	$\ln y = 5.98 + 3705.8/x^2$ $r^2 = 0.998$
S5	-	-	-	-
REC	$\ln y = 5.88 - 1374.4/x^2$ $r^2 = 0.982$	$\ln y = 10.55 - 23.82/\ln x$ $r^2 = 0.988$	$\ln y = 5.5 + 0.002x$ $r^2 = 0.999$	$\ln y = 8.07 - 20.72/x^{0.5}$ $r^2 = 0.993$

Table 2-Tissue water content (%) in fat snook *Centropomus parallelus*, under control conditions (AC – aquarium control; BC – basal control) or submitted to the essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (30 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$). Data presented as means \pm SEM (n = 6). No significant difference between groups was observed ($P > 0.05$).

Groups	tissue water content %			
	Freshwater		Seawater	
	gills	muscle	gills	muscle
BC	73.30 \pm 0.82	79.94 \pm 0.53	70.40 \pm 2.86	76.55 \pm 0.75
AC	72.25 \pm 0.63	79.48 \pm 0.31	72.33 \pm 0.96	77.65 \pm 0.73
30	74.05 \pm 1.60	80.77 \pm 0.42	70.70 \pm 1.94	78.60 \pm 0.61
300	73.00 \pm 1.18	80.17 \pm 0.84	68.50 \pm 0.80	76.36 \pm 0.60

Table 3 - Water parameters after the transport of fat snook *Centropomus parallelus* in plastic bags with the essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (15 or 30 $\mu\text{L L}^{-1}$) or ethanol (E) added to the water. W – control with only water in fresh- or seawater. Data presented as means \pm SEM ($n = 3$). No significant difference between the groups was observed ($P > 0.05$)

Groups	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Conductivity (mS)	Salinity (ppt)	pH (units)	Ammonia (mg L^{-1})	Ammonia excretion ($\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Freshwater						
W	24.97 ± 0.07	0.116 ± 0.01	0.07 ± 0.03	6.47 ± 0.06	3.28 ± 0.50	18.58 ± 2.74
E	25.23 ± 0.09	0.119 ± 0.00	0.03 ± 0.03	6.52 ± 0.09	2.40 ± 0.35	13.92 ± 2.55
15	25.20 ± 0.12	0.117 ± 0.00	0.10 ± 0.00	6.63 ± 0.12	2.18 ± 0.23	14.37 ± 1.17
30	25.13 ± 0.12	0.120 ± 0.00	0.10 ± 0.00	6.67 ± 0.11	3.08 ± 0.16	19.48 ± 0.92
Seawater						
W	28.66 ± 0.03	55.10 ± 0.24	33.80 ± 0.12	6.67 ± 0.03	3.14 ± 0.31	27.81 ± 2.28
E	28.86 ± 0.05	55.66 ± 0.10	34.03 ± 0.03	6.66 ± 0.02	2.92 ± 0.11	25.78 ± 0.57
15	27.70 ± 0.49	54.30 ± 0.62	33.93 ± 0.07	6.69 ± 0.02	3.06 ± 0.22	26.30 ± 1.61
30	27.80 ± 0.45	54.50 ± 0.41	33.90 ± 0.00	6.95 ± 0.03	2.85 ± 0.18	25.70 ± 0.54

Table 4 - Constituents of the young (EO-Y) and old leaves (EO-O) essential oil of *Nectandra megapotamica*. Where: RI_{lit} = retention index from literature; RI_{exp} = experimental retention index; NI = not identified; a = Adams (2001); b = databank NIST (2002)

Compound	RI _{lit}	EO-Y		EO-O	
		%	RI _{exp}	%	RI _{exp}
α-pinene	931 b	26.82	933	26.19	930
camphene	943 b	0.23	944	0.67	943
β-pinene	973 b	7.95	973	12.30	972
β-myrcene	991 a	1.38	991	2.39	990
limonene	1026 b	2.31	1026	4.61	1026
1,8-cineole	1029 b	0.27	1028	0.56	1028
β-cis-ocimene	1037 a	0.06	1037	-	-
β-trans-ocimene	1050 a	0.43	1048	0.74	1049
terpinolene	1086 b	0.07	1086	-	-
linalool	1097 a	0.28	1099	0.71	1100
δ-elemene	1338 a	0.22	1337	1.13	1338
α-copaene	1377 a	0.50	1376	0.46	1377
NI	-	-	-	0.18	1386
β-cubebene	1390 b	0.11	1390	0.15	1391
β-elemene	1393 b	0.11	1392	0.52	1393
β-caryophyllene	1420 b	1.48	1420	2.39	1421
α-caryophyllene	1455 a	0.37	1454	0.52	1455
germacrene D	1485 a	9.61	1484	9.20	1483
α-selinene	1490 b	0.25	1487	0.34	1488
bicyclogermacrene	1500 a	46.47	1501	34.56	1499
δ-cadinene	1523 b	0.63	1524	0.70	1525
trans-nerolidol	1563 a	0.14	1564	-	-
spathulenol	1578 a	-	-	1.06	1580
globulol	1585 a	0.17	1585	0.62	1587
NI	-	0.14	1593	-	-
Total identified		99.85		99.82	
Yield		0.30		0.20	

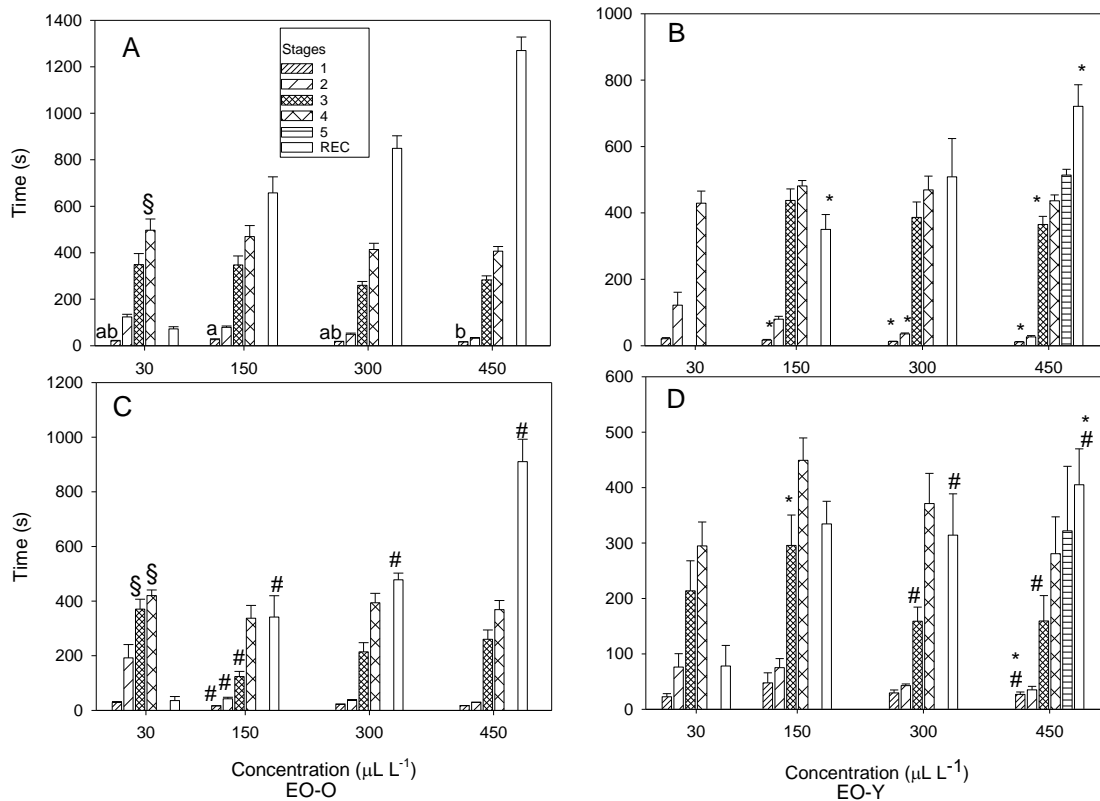


Figure 1

Figure 1 - Time (in seconds) required for the induction and recovery from anesthesia using the essential oil of *Nectandra megapotamica* in fat snook. Stages are according to Stoskopf (1993). Maximum observation time was 10 min. N=8 for each concentration tested. REC = recovery. A and B, seawater; C and D, freshwater. Different letters indicate a significant difference between the different concentrations of the same condition test; §, number of observations lower than 3 (data not used for statistical comparison); *, significantly different from EO-O in the same salinity; #, significantly different from seawater with the same essential oil.

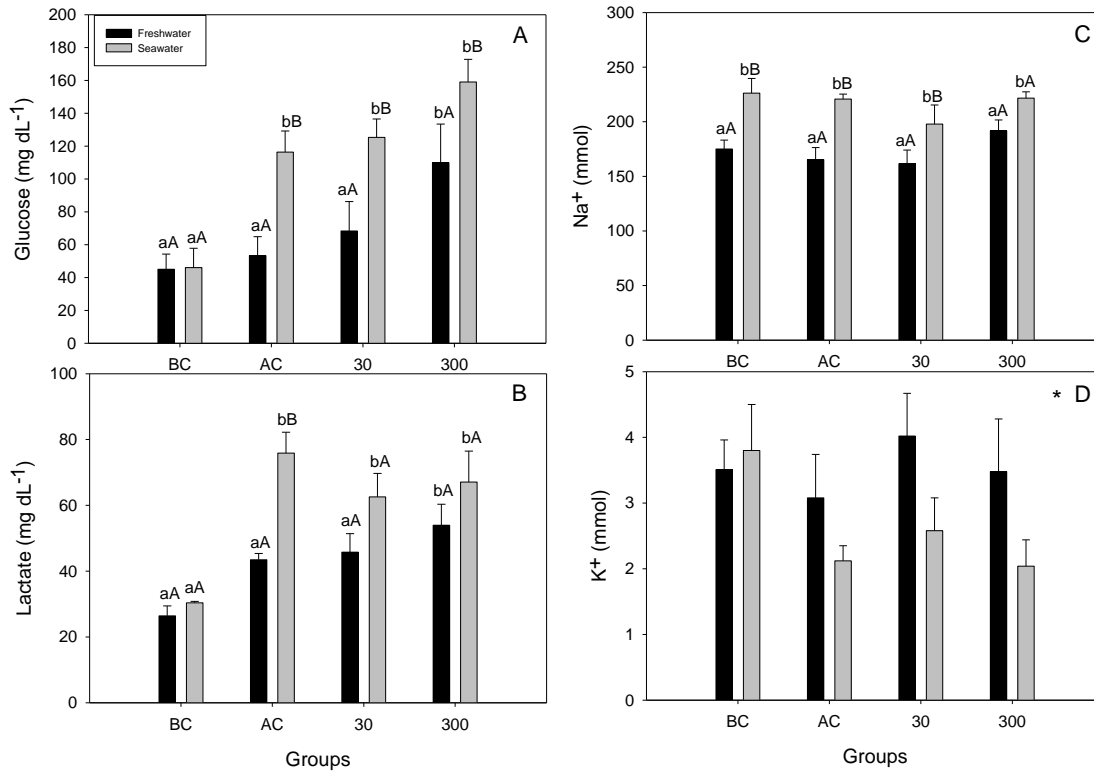


Figure 2

Figure 2 - Plasma glucose (A), lactate (B), Na⁺ (C) and K⁺ (D) levels in fat snook *Centropomus parallelus* acclimated to fresh- or seawater and exposed for 10 min to the essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (30 and 300 μL L⁻¹). AC - aquarium control; BC - basal control. Data presented as means ± SEM (n = 6). Different lower case letters indicate a significant difference between the groups in the same salinity, while capital letters indicate a significant difference between the salinities in the same group. * No significant difference between groups or salinities.

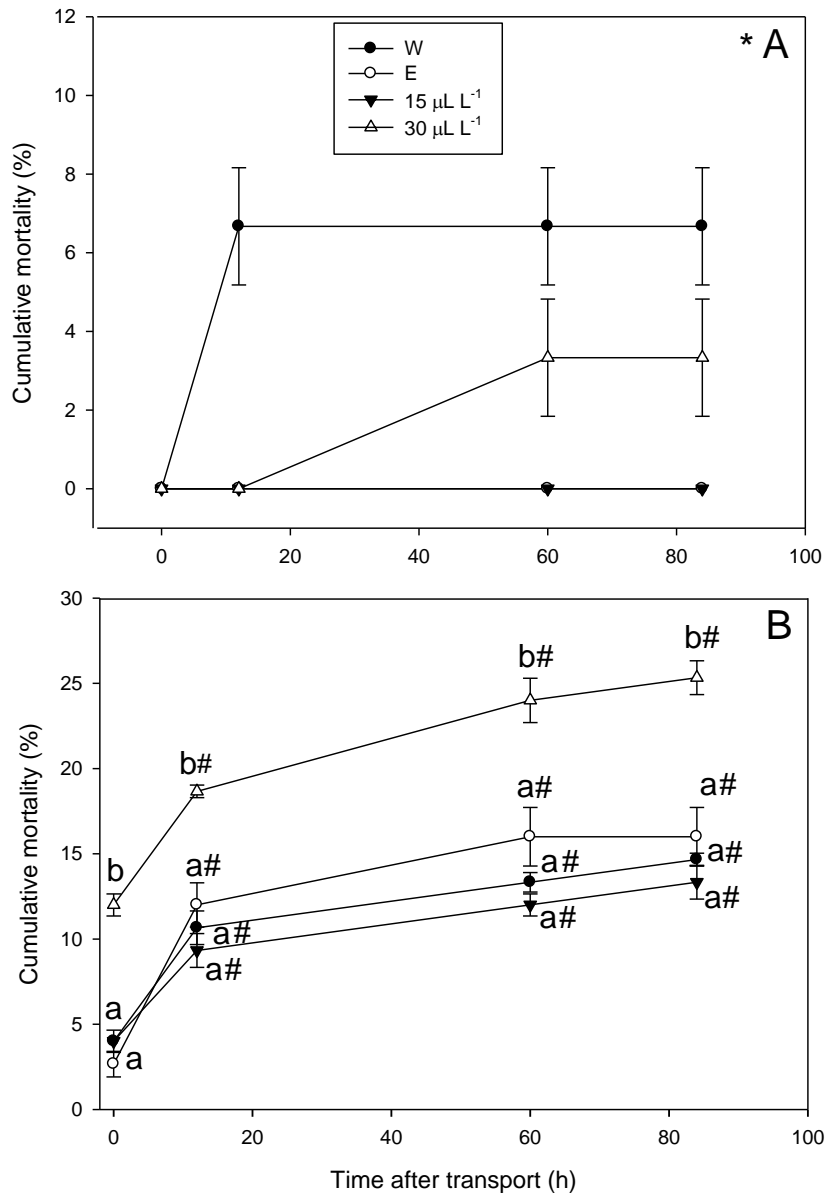


Figure 3

Figure 3 - Mortality after the transport of fat snook *Centropomus parallelus* in plastic bags with essential oil-O of *Nectandra megapotamica* (15 or 30 $\mu\text{L L}^{-1}$) or ethanol (E) added to the water. W – control with only water. A, freshwater; B, seawater. Data presented as means \pm SEM (n = 3). Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). # Significant difference from arrival (0 h). * No significant difference between the groups or times.

5. DISCUSSÃO GERAL

A análise da composição química do óleo essencial das folhas jovens (OE-J) e das folhas velhas (OE-V) de *N. megapotamica* mostrou a mesma composição qualitativa. Os constituintes majoritários foram biciclogermacreno, α - e β -pineno e germacreno D em ambos os OEs, mas a concentração das substâncias apresentou variação de acordo com o estágio de desenvolvimento das folhas. Romoff *et al.* (2010) encontraram o α -bisabolol como constituinte majoritário do OE desta espécie, coletada no estado de São Paulo em dois períodos distintos, verão e inverno. Outro estudo mostrou variação qualitativa para o OE das folhas, onde dois exemplares apresentaram α - e β -santaleno como substâncias majoritárias e, para o terceiro exemplar, muuro-la-4,10-(14)-dien-1- β -ol e δ -elemeno. Neste mesmo estudo, observou-se uma variação quali e quantitativa para o OE dos galhos, sendo que no indivíduo 1 os majoritários foram 5-iso-cedranol e α -muurolol, no indivíduo 2 α -bisabolol e 5-iso-cedranol, enquanto que no indivíduo 3 predominou α -muurolol (Brito, 2009).

A variabilidade na produção e teor dos óleos essenciais é conhecida por ser afetada por fatores ambientais tais como luz, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, período do dia, ciclo e parte da planta (Carvalho Filho *et al.*, 2006; Blank *et al.*, 2007; Abdelmageed *et al.*, 2011; Blank *et al.*, 2011), como também por fatores genéticos (Tavares *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009; Lamien Meda *et al.*, 2010). Os fatores ambientais, após um longo período, podem afetar genes responsáveis pela formação dos metabólitos secundários, originando ecotipos ou quimiotipos na mesma espécie vegetal (Figueiredo *et al.*, 2008). Barazani *et al.* (2002), consideram que um quimiotipo é uma entidade taxonômica, semelhante a um ecotipo, que difere do resto da população pela composição de seus metabólitos secundários. Desta forma, quimiotipos, também denominados raças químicas, podem ser considerados como uma população da mesma espécie que se adaptou ao local, sendo que tais populações podem mostrar alterações na morfologia, fisiologia ou fitoquímica da planta e que estão relacionadas ao habitat e são geneticamente induzidas.

Em nosso estudo, observamos que o rendimento do OE em folhas velhas foi inferior ao das folhas jovens. Variações no rendimento e na composição do OE com o desenvolvimento dos órgãos vegetais são comuns para muitas espécies de plantas aromáticas. Estas variações podem ser parcialmente explicadas pelos diferentes tipos de estruturas secretoras dos OEs. Plantas com estruturas secretoras mais externas podem liberar seu conteúdo com a maturação do órgão, devido ao rompimento da cutícula dos tricomas,

enquanto plantas com estruturas mais internas frequentemente mantêm um rendimento e composição mais estável (Figueiredo *et al.*, 2008). Além disso, outra característica importante é a dependência ao estágio de desenvolvimento do órgão, ou seja, a origem das folhas a partir dos tecidos primordiais, sua expansão até a maturidade plena e, finalmente, a perda pela senescência, que também afetam a produção e acumulação do OE (Sangwan *et al.*, 2001). O próprio papel do OE na defesa da planta também irá influenciar sua produção e acumulação. Os voláteis vegetais são produzidos em maior quantidade quando as plantas sofrem ataques de insetos fitófagos, como forma de deter os herbívoros (atuando como repelente ou intoxicante) e atrair seus predadores naturais (Dudareva *et al.*, 2006; Unsicker *et al.*, 2009). Estudos mostram certa preferência, por parte dos herbívoros, por folhas jovens, o que de certa forma poderia explicar a diferença no rendimento dos OEs obtidos neste trabalho (Coley, 1980; Barton e Koricheva, 2010).

A comparação da composição mostrou diferenças quantitativas entre os componentes do OE-J e OE-V, sendo que alguns diminuíram com a maturação da planta (por exemplo, biciclogermacreno e α -pineno), enquanto compostos como β -pineno, β -mirceno, limoneno, entre outros, aumentaram. Observação semelhante foi feita por Dudai *et al.* (2001) para o OE de folhas jovens e velhas de *Micromeria fruticosa* (L.) Druce (Lamiaceae), onde foi sugerido que estas variações podem estar relacionadas ao papel ecológico desempenhado pelo OE durante os diferentes estágios de crescimento. Em estudo realizado com folhas de *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) também foi observada variação quantitativa entre os OEs das folhas jovens e velhas, sendo que os autores propuseram que as diferenças devem-se mais à posição das folhas sobre os galhos do que propriamente à idade da folha. Uma vez que a posição da folha está relacionada com o desenvolvimento da planta, a idade fisiológica da mesma no momento da formação da folha a partir do tecido primordial é o fator que afeta a composição do OE (Fischer *et al.*, 2011). Em outro estudo com *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), observou-se que a quantidade relativa de eugenol e metileugenol diminuiu com o desenvolvimento das folhas que, de acordo com os autores, poderia ser explicado pelo uso dessas substâncias na síntese de lignina e/ou por outras oxidações de compostos fenólicos, catalisadas pelo aumento da atividade da polifenoloxidase e da peroxidase (Dey e Choudhuri, 1983 apud Figueiredo *et al.*, 2008).

Conforme citado no item 2.3 da revisão bibliográfica, os estágios de indução a anestesia em peixes, segundo Stoskopf (1993), variam desde leve perda de reatividade a estímulos táteis e visuais até a perda total de reatividade com mínimo movimento opercular. Os estágios iniciais caracterizam a sedação dos animais e os mais avançados a anestesia

propriamente dita. Frequentemente a sedação e a anestesia podem resultar da ação de fármacos sobre um mesmo receptor, diferindo apenas no número de receptores ocupados (Hemmings Jr et al., 2005).

Os resultados dos testes de atividade anestésica do OE-J e OE-V em alevinos de robalo-peva mostraram que a concentração de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi eficaz em induzir sedação leve nos peixes adaptados a ambas salinidades. Com concentrações de 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ ou maiores a indução de anestesia profunda foi atingida entre 5,6-8,0 min. O tempo para recuperação da anestesia induzida por estas concentrações variou entre 5,5-11,0 min. Estudos com OEs de diferentes espécies de plantas têm mostrado resultados variados com relação à eficácia e segurança, na dependência da composição química do OE, do tamanho do animal e da espécie de peixe testada.

O mentol é o constituinte majoritário dos OEs obtidos de espécies do gênero *Mentha* e, quando testado em *Colossoma macropomum* na concentração de 100 mg L^{-1} , induziu à anestesia profunda (estágio 4) em 4,39 min e a recuperação ocorreu em 5,04 min (Façanha e Gomes, 2005). Para a mesma concentração, testada em *Piaractus mesopotamicus*, o tempo de indução e recuperação da anestesia foi inferior a 2 min (Gonçalves *et al.*, 2008). Já Simões e Gomes (2009), em testes com tilápia do Nilo, encontraram a concentração de 250 mg L^{-1} como ideal para induzir anestesia profunda, com média de tempo de indução e recuperação de 9 min. Testes com OE de *Lippia alba* mostraram que o mesmo estágio de anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*), foi alcançado em 3,8 min na concentração de 300 mg L^{-1} e a recuperação ocorreu em 6,4 min (Cunha *et al.*, 2010a). O estágio 4 também foi observado em carpa comum (*Cyprinus carpio*) dentro de 3,8 min, com recuperação em 6,0 min com o uso de 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ do OE de melaleuca (*Melaleuca aternifolia*) (Hajek, 2011). O efeito do eugenol, principal componente do óleo de cravo, varia de acordo com a espécie de peixe, mas concentrações entre 30-50 mg L^{-1} geralmente são suficientes para induzir anestesia profunda dentro de 2-8 min em pacu vermelho (*Piaractus brachypomus*) (Sladky *et al.*, 2001), matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Inoue *et al.*, 2003), salmão do atlântico (*Salmo solar*) (Iversen, 2003), jundiá (Cunha *et al.*, 2010b) e douradinho (*Carassius auratus*) (Abdolazizi *et al.*, 2011). O tempo de recuperação com o uso de eugenol varia de 1 a 10 min.

A eficácia dos agentes anestésicos pode ser afetada por fatores biológicos e ambientais. Os fatores biológicos estão relacionados à espécie, tamanho, idade e sexo, peso e condições fisiológicas, enquanto que, dentre os fatores ambientais encontram-se a salinidade, o pH, nível de oxigênio e temperatura da água (Ross e Ross, 2008). Neste estudo nós comparamos a atividade anestésica do OE de *N. megapotamica* em diferentes salinidades

através da avaliação dos tempos de indução e recuperação da anestesia e, em termos gerais, observou-se uma redução no tempo de indução e recuperação em peixes adaptados à água doce. De forma semelhante, Ghazilou *et al.* (2010) observaram que a exposição do salmão do Cáspio (*Salmo trutta caspius* K.) ao óleo de cravo em diferentes salinidades ocasionou um aumento do tempo de indução à anestesia conforme aumentava a salinidade. De acordo com Ross e Ross (2008), devido à capacidade de tamponamento da água salgada e aos seus constituintes iônicos, o efeito de alguns fármacos em água salgada pode ser modificado, inclusive para a mesma espécie de peixe.

Biciclogermacreno, α - e β -pineno e germacreno D são os componentes principais do OE testado e estes compostos podem estar relacionados ao efeito farmacológico observado. Na literatura, tanto o α - quanto o β -pineno têm sido relatados como sedativos (Mercier *et al.*, 2009) e analgésicos (Erazo *et al.*, 2006). Kasanen *et al.* (1998) também relataram que todos os pinenos induzem sedação seguida por sinais de anestesia em camundongos. Além disso, o α -pineno é reportado como um modulador positivo dos receptores gabaérgicos do subtipo A ($GABA_A$) (Aoshima e Hamamoto, 1999). Estes receptores são reconhecidos como alvos importantes para a modulação por agentes sedativos, ansiolíticos e anestésicos gerais (Frank e Lieb, 1994). Estudo comparativo da ação do mentol sobre os receptores $GABA_A$ com anestésicos sedativos (benzodiazepínicos) e intravenosos (barbitúricos, esteroides, etomidato e propofol), concluiu que o mentol exerce sua atividade em sítios distintos daqueles dos benzodiazepínicos, barbitúricos e esteroides, ainda, que o mesmo compartilha a ação anestésica com o propofol, possivelmente sobre os mesmos sítios do receptor $GABA_A$ (Watt *et al.*, 2008). Del-Vechio-Vieira *et al.* (2009) descreveram a atividade analgésica do OE das folhas de *Ageratum fastigiatum* em camundongos, o qual continha germacreno D como constituinte majoritário. Na busca em base científica não foram encontrados artigos relacionando atividade anestésica ao biciclogermacreno.

Os agentes anestésicos são amplamente utilizados em aquicultura para minimizar o estresse e prevenir possíveis injúrias físicas durante as práticas de manuseio e transporte (Iversen *et al.*, 2009). Em relação ao mecanismo de ação de alguns anestésicos utilizados convencionalmente em aquicultura, relatos da literatura informam que eles atuam inibindo o estresse através da redução ou bloqueio da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI). Falhas na supressão da atividade deste eixo durante o estresse resultam em liberação rápida de catecolaminas e consequente aumento nos níveis circulantes de glicose e lactato (Rotllant *et al.*, 2001; Barton, 2002).

Os resultados observados no presente estudo mostram que o OE-V de *N. megapotamica* não minimizou os efeitos do manuseio em robalos-peva adaptados à água salgada. Além disso, nos animais mantidos em água doce e expostos à maior concentração testada deste OE, aparentemente houve indução de estresse, uma vez que os níveis plasmáticos de glicose e lactato foram significativamente maiores nestes peixes do que naqueles de outros tratamentos. Níveis elevados de glicose também foram observados após indução da anestesia com eugenol em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Holloway *et al.*, 2004), carpa comum (Velisek *et al.*, 2005) e “rock bream” (*Oplegnathus fasciatus*) (Park *et al.*, 2009). O mesmo ocorreu com eugenol e MS-222 em pacu vermelho e os autores sugeriram que, de maneira semelhante ao que ocorre com mamíferos, este aumento nos níveis de glicose seria devido à gliconeogênese induzida por catecolaminas (Sladky *et al.*, 2001). A elevação da concentração plasmática de lactato também foi reportada com o uso de eugenol em tilápia do Nilo (Deriggi *et al.*, 2006). Morales *et al.* (2005) relataram aumento dos níveis plasmáticos de glicose e lactato em dentex comum (*Dentex dentex*) como consequência do manuseio e relacionaram o mesmo ao catabolismo do glicogênio hepático e à hidrólise do glicogênio muscular, respectivamente. O uso do mentol em tilápia do Nilo também causou um aumento significativo da glicose plasmática, indicando estresse do animal (Simões e Gomes, 2009).

Entre as respostas secundárias ao estresse podem ser observados distúrbios osmorregulatórios, que são evidenciados através das alterações no conteúdo de água nos tecidos e nos níveis plasmáticos de íons. O conteúdo de água dos músculos e brânquias pode ser utilizado como um índice fisiológico para avaliar o equilíbrio do conteúdo de água em peixes (Lee *et al.*, 2009). Nossos resultados não mostraram diferença significativa no conteúdo de água do músculo e das brânquias do robalo-peva, bem como os níveis plasmáticos de Na^+ e K^+ entre peixes anestesiados e controles na mesma salinidade. No entanto, robalos-peva adaptados à água salgada mostraram níveis plasmáticos mais elevados de Na^+ que os adaptados à água doce. Isto é esperado, porque a adaptação à água doce ou salgada pode alterar os parâmetros osmorregulatórios em algumas espécies. Por exemplo, a aclimatação à água salgada aumentou a osmolalidade em tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) (Fiess *et al.*, 2007) e os níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- no linguado europeu (*Platichthys flesus*) (Lundgreen *et al.*, 2008), comparado às mesmas espécies adaptadas em água doce.

Durante o processo de transporte os peixes são submetidos a uma série de fatores estressantes, entre eles o manuseio, choques mecânicos, excesso de barulho e baixa qualidade

da água, que pode resultar em alterações fisiológicas e mortalidade pós-transporte. Controle da qualidade da água e seditação dos peixes durante o transporte podem ser ferramentas úteis para minimizar este problema (Ross e Ross, 2008). Em nosso estudo, a qualidade da água ao fim do período de transporte foi mantida dentro dos valores aceitáveis para robalos (Alvarez-Lajonchere e Tsuzuki, 2008). No entanto, a adição do OE-V à água de transporte não reduziu a excreção de amônia e, conseqüentemente, não preveniu a deterioração da água. Além disso, a mortalidade não foi menor com o uso do OE-V, ao contrário, os peixes transportados com a concentração mais elevada do OE em água salgada tiveram uma taxa de mortalidade significativamente maior que a dos outros grupos.

6. CONCLUSÕES

* O OE de *Nectandra megapotamica*, nas concentrações testadas, mostrou-se eficaz para indução de sedação e anestesia em *Centropomus parallelus*.

* A concentração de OE necessária para indução de sedação leve é de $30 \mu\text{L L}^{-1}$ e para anestesia profunda de $150 \mu\text{L L}^{-1}$ ou superior.

* A atividade anestésica dos OEs, de maneira geral, foi semelhante, tendo se destacado o OE-J em água doce.

* O OE-V de *Nectandra megapotamica*, nas concentrações testadas, não preveniu o estresse gerado pelo manuseio e transporte dos animais não sendo, portanto, um anestésico ideal para essa espécie.

* A análise química do OE-J e OE-V de *Nectandra megapotamica* mostrou a mesma constituição qualitativa, sendo os componentes majoritários: biciclogermacreno, α - e β -pineno e germacreno D e diferindo da composição previamente relatada para o OE desta espécie.

* A composição quantitativa mostrou variação, com decréscimo dos componentes biciclogermacreno e α -pineno e incremento de β -pineno, β -mirceno e limoneno no OE-V.

7. PERSPECTIVAS

* Isolamento dos componentes do OE de *N. megapotamica* com potencial anestésico devem ser conduzidos.

* Testes da atividade anestésica das substâncias isoladas em diferentes espécies de peixes devem ser realizados, a fim de melhor elucidar a atividade anestésica apresentada por este OE.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGEED, A. et al. The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical composition of the essential oils of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 15, p. 3432-3439, 2011.
- ABDOLAZIZI, S. et al. Effects of clove oil as an anesthetic on some hematological parameters of *Carassius auratus*. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 02, n. 01, p. doi:10.4172/2155-9546.100010, 2011.
- AIBA, C. J. et al. Neolignans from *Nectandra miranda*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 6, p. 745-748, 1977.
- ALVAREZ-LAJONCHERE, L. et al. Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 4, p. 506-516, 2002.
- ALVAREZ-LAJONCHERE, L.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 7, p. 684-700, 2008.
- ALVES, E. O. et al. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 2, p. 651-658, 2008.
- ALVES, M. F.; SARTORI, A. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 118-129, 2009.
- AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 743-748, 1999.
- APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from Atlantic rain forest (São Paulo - Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3-4, p. 199-235, 2007.
- BAITELLO, J. B. et al. Lauraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J., et al (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Editora Rima, v. 3, 2003. p.149-223.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 1, p. 23-30, 2007.

BARATTA, M. T. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 6, p. 618-627, 1998.

BARAZANI, O. et al. Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 8, p. 721-731, 2002.

BARBOSA, M. C. et al. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 795-801, 2011.

BARRA, A. Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 8, p. 1147-1154, 2009.

BARROSO, M. V. et al. Nutritive value for some ingredients for snook (*Centropomus parallelus*). **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 31, n. 6, p. 2157-2164, 2002.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

BARTON, K. E.; KORICHEVA, J. The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta analysis. **The American Naturalist**, v. 175, n. 4, p. 481-493, 2010.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils : science, technology, and applications**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. 975

BIRCAN-YILDIRIM, Y. et al. The anaesthetic effects of quinaldine sulphate, muscle relaxant diazepam and their combination on convict cichlid, *Cichlasoma nigrofasciatum* (Günther, 1867) juveniles. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 3, p. 547-550, 2010.

BLANK, A. F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.

BLANK, A. F. et al. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 831-837, 2011.

BÖHLKE, M. et al. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 576-580, 1996.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez**. 2009. 105 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415-421, 2004.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists, 2000. xxxix, 1367 p.

BURKA, J. et al. Drugs in salmonid aquaculture—a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 333-349, 1997.

CALIXTO, J. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 297-304, 2001.

CARTER, K. M.; WOODLEY, C. M.; BROWN, R. S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 1, p. 51-59, 2011.

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.

CEOLIN, G. B.; ROSITO, J. M.; DO CANTO-DOROW, T. S. Leaf surface characters applied to Lauraceae taxonomy in a seasonal forest of Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1453-1460, 2009.

CERQUEIRA, V.; TSUZUKI, M. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 17-28, 2009.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-53, 2006.

CHINCHILLA-CARMONA, M. et al. Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 84, n. 1, p. 115-123, 2011.

CHO, G. K.; HEATH, D. D. Comparison of tricaine methanesulfonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 31, n. 6, p. 537-546, 2000.

CICCIÓ, J. F.; CHAVERRI, C.; DÍAZ, C. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 417-420, 2009.

COE-TEIXEIRA, B. Lauráceas do gênero *Ocotea*, do Estado de São Paulo. **Rodriguésia**, v. 32, n. 52, p. 55-190, 1980.

COLEY, P. D. Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. **Nature** v. 284, n. 5756, p. 545-546, 1980.

COMAI, S. et al. Essential oil of *Lindera neesiana* fruit: Chemical analysis and its potential use in topical applications. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2010.

COUTINHO, D. F. et al. Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 5, p. 482-484, 2007.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010a.

CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107-2114, 2010b.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 42-45, 2004a.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 10, p. 1307-1310, 2008.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1179-1184, 2004b.

DE ARAÚJO, D. A. M.; FREITAS, C.; CRUZ, J. S. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v. 89, p. 540-544, 2011.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of essential oil from *Ageratum fastigiatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1115-1121, 2009.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 269-274, 2006.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUDAI, N. et al. Developmental control of monoterpene content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. **Annals of Botany**, v. 88, n. 3, p. 349, 2001.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ERAZO, S. et al. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 395-400, 2006.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69, 2001.

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

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fisheries and Aquaculture Department, Fishery and Aquaculture Statistics, Capture Production – yearbook 2008. Disponível em: < ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2008/root/capture/b33.pdf > p.127. Acesso em: 27/12/2011.

Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA, 2010. 546 p.

FDA. (U.S. Food and Drug Administration) Database of approved animal drugs products. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. VMRCVM Drug Information Laboratory. 2006. Disponível em: < <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/AnimalDrugsAtFDA/details.cfm?dn=042-42> >. Acesso em: 07/10/2011.

FIESS, J. C. et al. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 2, p. 252-264, 2007.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FISCHER, R. et al. Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4913-4922, 2011.

FRANK, N.; LIEB, W. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 607-614, 1994.

GARCEZ, F. R. et al. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GHAZILOU, A. et al. The anesthetic efficiency of clove oil in caspian salmon, *Salmo trutta caspius* K., smolts in dosage-salinity-pH linked approach. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 4, p. 655-660, 2010.

GIMBO, R. Y. et al. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011.

GOMES, L. C. et al. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 283-290, 2003.

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

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

GOTTLIEB, O. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1537-1570, 1972.

GOTTLIEB, O. et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981.

HAJEK, G. J. The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 296-300, 2011.

HAJLAOUI, H. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2227-2238, 2009.

HEMMINGS JR, H. C. et al. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. **Trends in the Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 10, p. 503-510, 2005.

HOLLOWAY, A. C. et al. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, 2004.

INOUE, L. A. K. A. et al. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.

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

IVERSEN, M. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 549-566, 2003.

IVERSEN, M.; ELIASSEN, R. A.; FINSTAD, B. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 2, p. 233-241, 2009.

JACHAK, S. M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, v. 92, n. 9, p. 1251-1257, 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 547-562, 2011.

KAISER, H. et al. Testing clove oil as an anaesthetic for long-distance transport of live fish: the case of the Lake Victoria cichlid *Haplochromis obliquidens*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 6, p. 510-514, 2006.

KAMATOU, G.; VILJOEN, A. Linalool- A review of a biologically active compound of commercial importance. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, p. 1183-1192, 2008.

KASANEN, J. P. et al. Stereospecificity of the sensory irritation receptor for nonreactive chemicals illustrated by pinene enantiomers. **Archives of Toxicology**, v. 72, n. 8, p. 514-523, 1998.

KEENE, J. L. et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 2, p. 89-101, 1998.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 265-277, 2004.

KIESSLING, A. et al. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, v. 286, n. 3-4, p. 301-308, 2009.

KRÜGEL, M. M.; BURGER, M. I.; ALVES, M. A. Frugivoria por aves em *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) em uma área de Floresta Estacional Decidual no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 96, n. 1, p. 17-24, 2006.

LAMIEN MEDA, A. et al. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 2, p. 75-82, 2010.

LE QUESNE, P. W.; LARRAHONDO, J. F.; RAFFAUF, R. F. Antitumor plants. X. Constituents of *Nectandra rigida*. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 3, p. 353-359, 1980.

- LEE, T. H. et al. Constant muscle water content and renal HSP90 expression reflect osmotic homeostasis in euryhaline teleosts acclimated to different environmental salinities. **Zoological Studies**, v. 48, n. 4, p. 435-441, 2009.
- LONGHI, S. J. et al. Aspectos fitossociológicos de fragmento de floresta estacional decidual, Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 59-74, 2000.
- LUNDGREEN, K. et al. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 178, n. 7, p. 909-915, 2008.
- MACCHIONI, F. et al. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 111-114, 2006.
- MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **The Open Marine Biology Journal**, v. 5, n. 1, p. 24-33, 2011.
- MARQUES, C. A. Importância da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.
- MELO, J. O. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006.
- MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (alpha- and beta-pinenes): a review. **International Journal of Occupational Medicine Environmental Health**, v. 22, n. 4, p. 331-342, 2009.
- MIGUITA, C. H. et al. Constituintes químicos das cascas do caule e das folhas de *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia - SP, p. PN-286, 2007. Disponível em: <<https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1920-2.pdf>>. Acesso em: 09/08/2010.
- MORALES, A. E. et al. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 6, p. 620-620, 2005.
- MORENO, P. et al. Chemical constituents and antitumour activity of *Nectandra grandiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 31, n. 3, p. 189-192, 1993.
- MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 127-137, 2000.
- NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. **ILAR Journal**, v. 50, n. 4, p. 343-360, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

- OLIVEIRA, J. R. et al. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, 2009.
- PARK, M. O. et al. Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 427-430, 2009.
- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.
- RIVAS, L. R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, n. 3, p. 579-611, 1986.
- ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1119-1121, 2010.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3rd. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell, 2008. xii, 222 p.
- ROTLLANT, J. et al. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 333-342, 2001.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.
- SANTOS FILHO, D. D.; GILBERT, B. Alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 821-822, 1975.
- SATO, T. et al. Selective inhibition of monoamine neurotransmitter transporters by synthetic local anesthetics. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, n. 2, p. 214-220, 2000.
- SAYYAH, M. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 733-736, 2003.
- SAYYAH, M.; VALIZADEH, J.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 212-216, 2002.
- SETZER, W. et al. Cruzain inhibitory activity of leaf essential oils of Neotropical Lauraceae and essential oil components. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1203-1210, 2007.

SIGMA. Material safety data sheet: ethyl 3-aminobenzoate methanesulphonate, E10521. 2010. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/site-level/msds.html> >. Acesso em: 07/10/2011.

SILVA, J. R. D. A. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SIMIC, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004.

SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.

SLADKY, K. K. et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SMITH, T. A. Tryptamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2-B, p. 171-175, 1977.

STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine**. London, UK: Pergamon Veterinary Handbook Series, 1993. p.161-168.

TAVARES, E. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 1, 2005.

TEMPLE, S.; CERQUEIRA, V. R.; BROWN, J. A. The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860). **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 205-217, 2004.

TONINI, H.; FINGER, C. A. G.; SCHNEIDER, P. R. O crescimento da *Nectandra megapotamica* Mez., em floresta nativa na depressão central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 85-90, 2003.

TORRES, A. M. et al. Examen del aceite esencial de *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Corrientes, p. E-013, 2005. Disponível em: < www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/8-Exactas/E-013.pdf >. Acesso em: 10/03/2011.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden: *Nectandra megapotamica*. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/17801556?tab=synonyms> >. Acesso em: 04/10/2011.

UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 4, p. 479-485, 2009.

VALLEY, P. S. M.; SCORA, C. A. R. W. **Phytochemistry of *Nectandra umbrosa* berries, cloudforest food of the resplendent Quetzal**: California Avocado Society. Yearbook v. 83, p. 163-171, 1999.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, n. 3, p. 419-432, 1996.

VELISEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

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, n. 4, p. 357-362, 2007.

VILLAMIZAR, V. E. M. Actividad biológica (farmacológica) y/o etnomédica; y compuestos fitoquímicos aislados de algunas especies de los géneros: *Persea*, *Laurus*, *Lindera*, *Aniba*, *Phoebe*, *Nectandra*, *Cassytha*, *Cinnamon*, *Licaria*, *Ravensara*, *Pleurothyrium*, *Dehaasia*, *Apollonias* y *Neolitsia* (Lauraceae). **Duazary**, v. 7, n. 1, p. 130-151, 2010.

WATT, E. E. et al. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA_A receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, n. 1-3, p. 120-126, 2008.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WERKA, J.; BOEHME, A.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007.

WU, X. et al. A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 6, p. 465-468, 2006.

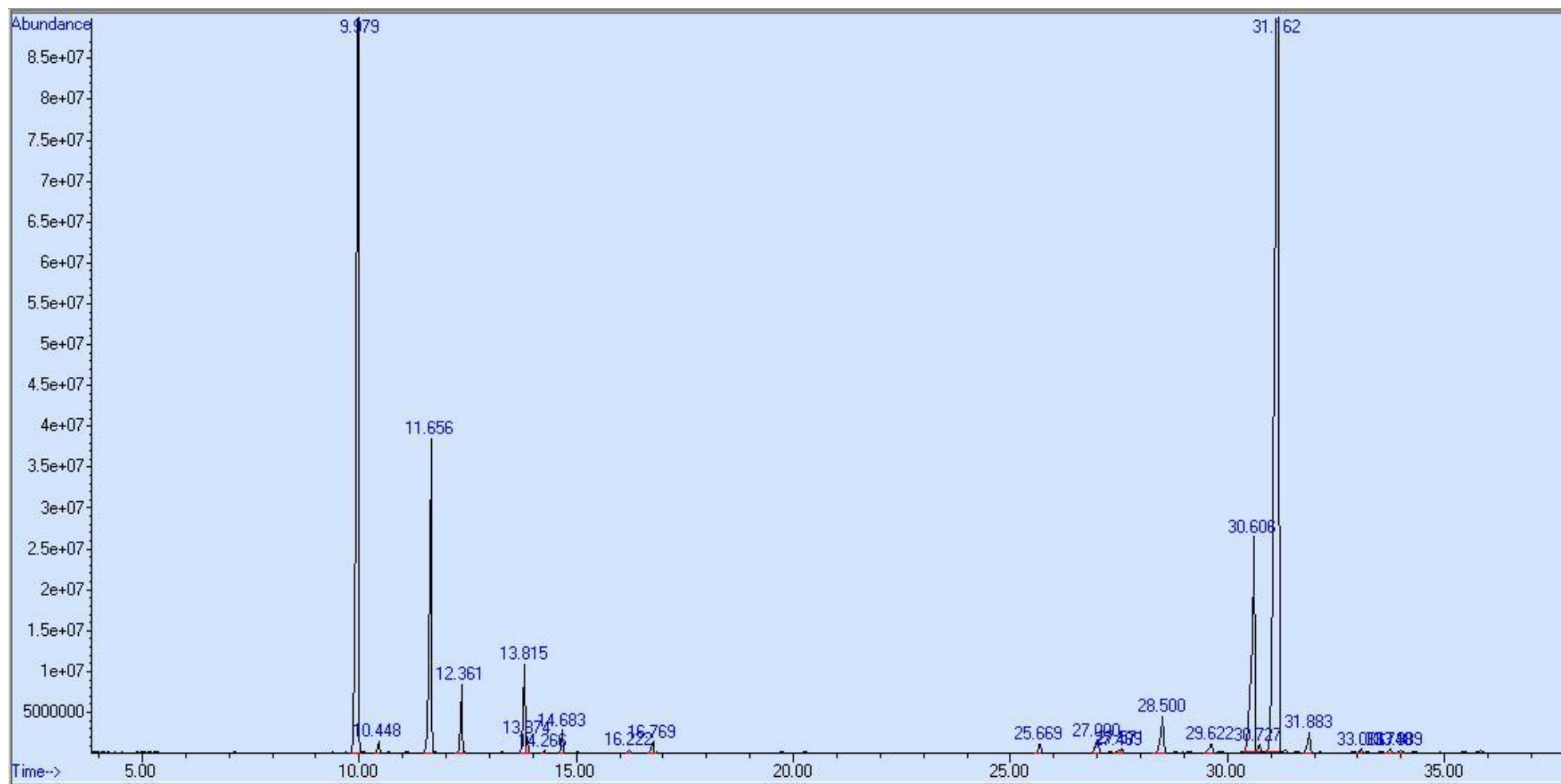
YAN, R. et al. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 451-455, 2009.

ZANON, M. M. F.; GOLDENBERG, R.; MORAES, P. L. R. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb.(Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 22-35, 2009.

ZHANG, X. et al. Essential oil variations in different *Perilla* L. accessions: chemotaxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 281, n. 1, p. 1-10, 2009.

9. ANEXOS

9.1. Cromatograma do óleo essencial das folhas jovens de *Nectandra megapotamica* obtido através de CG/MS



9.2. Cromatograma do óleo essencial das folhas velhas de *Nectandra megapotamica* obtido através de CG/MS

