



Universidade Federal do Oeste do Pará
Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação Tecnológica
Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas
Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais
Amazônicos

**TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL ANESTÉSICO DO HIDROLATO
DE *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. EM JUVENIS DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*)**

ANDRIA SIMONE OLIVEIRA VALENTE

Santarém, Pará

2018

ANDRIA SIMONE OLIVEIRA VALENTE

TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL ANESTÉSICO DO HIDROLATO DE *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Orientadora: Professora Dra. LENISE VARGAS FLORES DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos pela Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém, Pará

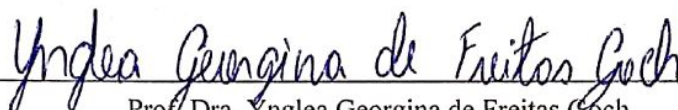
2018

ANDRIA SIMONE OLIVEIRA VALENTE

TOXICIDADE AGUDA E POTENCIAL ANESTÉSICO DO HIDROLATO DE
Myrcia sylvatica (G.Mey.) DC. EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma*
macropomum)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre em Recursos
Aquáticos Continentais Amazônicos pela
Universidade Federal do Oeste do Pará.

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2018



Prof. Dra. Ynglea Georgina de Freitas Goch

Vice Coordenadora do PPGRACAM-UFOPA

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos professores:



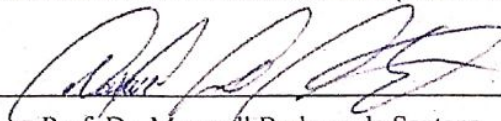
Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira

Universidade Federal do Oeste do Pará (ICED-UFOPA)



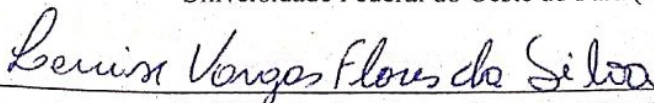
Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes

Universidade Federal do Oeste do Pará (ICTA-UFOPA)



Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana

Universidade Federal do Oeste do Pará (ICTA-UFOPA)



Prof. Dra. Lenise Vargas Flores da Silva (ICTA-UFOPA)

ORIENTADORA

Santarém, Pará

Fevereiro de 2018

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIGI/UFOPA**

- V154t Valente, Andria Simone Oliveira
Toxicidade aguda e potencial anestésico do hidrolato de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. em juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). / Andria Simone Oliveira Valente. – Santarém, 2018.
54 fls.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientador Lenise Vargas Flores da Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos Continentais Amazônicos.
1. Anestesia. 2. Concentração letal. 3. Fluxo iônico. I. Silva, Lenise Vargas Flores da, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 639.3

Bibliotecário - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

Sinopse:

Avaliou-se o potencial anestésico e a toxicidade aguda (CL_{50-96h}) do hidrolato de *Myrcia sylvatica* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se análises dos parâmetros físico-químicos da água, fluxo iônico e densidade de células mucosas branquiais.

Palavras-chaves: Anestesia, concentração letal, fluxo iônico, células mucosas, hidrolato.

Dedico este trabalho a meus familiares em especial meus pais Ademar e Rionete, que sempre não mediram esforços para que seus filhos pudessem se formar, ao meu filho que sempre sofreu com a ausência de sua mãe, mas que sempre tentou me entender. Dedico, enfim, a todos que estiveram me apoiando durante essa trajetória, que acreditaram na minha capacidade e que estiveram comigo ao longo de cada dia estressante. E, dedico ao meu Deus, Pai soberano a quem recorro nas minhas horas de angústia, suplicando por força e determinação.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, oportunidades concedidas e força para superar cada obstáculo, que não foram poucos neste percurso.

A minha irmã Ádria que me incentivou a fazer o mestrado e acreditou que eu seria capaz.

A minha orientadora professora Dra Lenise Vargas Flores da Silva pelo companheirismo, humanidade, paciência e amizade. Por ter sido tão compreensiva no momento que precisei.

A Estação de produção de Peixes UAGRO-Santa Rosa/-SEDAP- Santarém pela disponibilidade dos alevinos e do espaço para realização da pesquisa. Em especial ao Sr. Zacarias de Oliveira e sua equipe.

Ao Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Pará - LabBBEx, através da professora Dra. Rosa Helena Veras Mourão pela parceria nas extrações e análises químicas do hidrolato, e aos colegas Daiane, Antonio Junior, Adenilson e Mariana que me auxiliaram nesses processos.

Aos colegas do Laboratório de Química Multiusuário, em especial Elen Monique que me acolheu e me ajudou em cada etapa do curso, pela amizade companheirismo e auxílio durante as atividades. Aos demais colegas que me auxiliaram principalmente no momento em que estive doente, Jonas, Janna, Hugo Napoleão (Chefinho), Sand Dara e Raiane Caroline (minhas filhotas). O meu muito obrigada a todos vocês.

Aos amigos que fiz pelas turmas que passei, que me acolheram quando eu me sentia um peixe fora d'água.

A minha única companheira de turma, Débora Gomes, pessoa única, sem igual.

Aos professores e amigos que auxiliaram direta e indiretamente para a realização do meu processo de formação.

Obrigada a todos.

Resumo

Produtos naturais estão sendo testados como anestésicos em peixes, afim de mitigar efeitos do estresse causados por técnicas de manejo aplicadas na aquicultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do hidrolato *Myrcia sylvatica* (HMS), como anestésico em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), bem como avaliar sua Concentração Letal (CL_{50-96h}) do HMS. Para o teste de anestesia foi utilizado o HMS nas concentrações 15, 20, 25, 30 e 35%, com 15 animais por tratamento. Foram utilizadas as concentrações 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% de HMS para determinar a CL_{50-96h}. As variáveis físico-químicas (temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido) das soluções foram avaliadas antes e após o teste. Foram coletadas amostras das soluções antes e após a CL_{50-96h} para avaliar o fluxo de íons Na⁺, K⁺, Cl⁻, e amônia. Foi determinada a densidade de células mucosas (DCM) após 96 horas de exposição ao HMS. Os resultados evidenciaram que a concentração 30% de HMS teve os melhores tempos de indução e recuperação anestésica, sendo indicado para manejos rápidos (cerca de 3 min). O teste de toxicidade aguda estimou a CL₅₀₋₉₆ em 11,19% de HMS. Juvenis de tambaquis expostos ao HMS por 96 horas apresentaram elevada excreção de amônia e efluxo de íons quando comparados com o tratamento controle, aumentando com a concentração de hidrolato. Entretanto, foi verificada a diminuição da DCM com o aumento da concentração de HMS. As concentrações testadas de HMS não são indicadas para manejos prolongados, pois induziram a estresse osmorregatório.

Palavras-chaves: Anestesia, concentração letal, fluxo iônico, células mucosas, hidrolato

Abstract

Acute toxicity and anesthetic potential of hydrolate of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. in juvenile of tambaqui (*Colossoma macropomum*): Natural products are being tested as anesthetics in fish, in order to mitigate the effects of stress caused by management techniques applied in aquaculture. The objective of this work was to evaluate the use of *Myrcia sylvatica* hydrolate (MSH) as anesthetic in tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*), well as assess the lethal concentration (LC_{50-96h}). The concentrations of MSH used to anesthesia experiments, were 15, 20, 25, 30 and 35% (15 fish per treatment). The lethal concentration tested were used 5, 7.5, 10, 12.5 and 15% of MSH concentrations. The physical-chemical variables (temperature, pH, electric conductivity and dissolved oxygen), flow of Na⁺, K⁺, Cl⁻, ammonia and alkalinity of the solutions were evaluated before and after test. The gill mucous cell density (MCD) was determined after 96 hours of exposure to HMS. The 30% concentration of MSH had the best anesthetic induction and recovery times and was indicated for fast handling (about 3min). The acute toxicity test estimated CL₅₀ in 11,19% of MSH. Juveniles of tambaquis exposed to MSH for 96 hours presented high excretion of ammonia and efflux of ions, increased with concentration of hydrolate increases. The MCD decreased with increase the concentration of MSH. Thus, the concentration tested of HMS are not indicated for prolonged managements was suggested, because induced osmoregulatory stress.

Key words: Anesthesia, lethal concentration, ionic flow, mucous cell, hydrolate

| | |
|--|------|
| SUMÁRIO | |
| AGRADECIMENTOS | vi |
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| OBJETIVOS | 16 |
| Geral | 16 |
| Específicos | 16 |
| ARTIGO: Toxicidade aguda e potencial anestésico do hidrolato de <i>Myrcia sylvatica</i> (G. Mey) DC. em juvenis de tambaqui (<i>Collossoma macropomum</i>) | 17 |
| Resumo | 17 |
| Material e Métodos | 21 |
| Material Vegetal | 21 |
| Extração do hidrolato | 21 |
| Procedimento Experimental | 22 |
| Análise histológica e densidade de células mucosas branquiais | 23 |
| Análise estatística | 24 |
| Resultados | 24 |
| Caracterização química do Hidrolato | 24 |
| Indução e recuperação anestésica e Concentração Letal | 25 |
| Parâmetros físico-químicos | 27 |
| Densidade de células mucosas branquiais | 28 |
| Discussão | 29 |
| Conclusão | 33 |
| Agradecimento | 33 |
| Referências Bibliográficas | 34 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 40 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| ANEXO A: Normas para submissão de artigos para a revista Journal os Applied Ichthyology | 47 |
| ANEXO B: Declaração da Avaliação do Comitê de Ética | 54 |

Introdução Geral

A produção aquícola está em constante crescimento, podendo chegar em 195,9 milhões de toneladas em 2025, um crescimento de 17% em relação a produção de 2013-2015. Os países da América Latina podem ter um aumento de 26%, sendo que para o Brasil estima-se um crescimento de 104% (FAO, 2016).

Sendo o Brasil um dos poucos países com potencial para atender à crescente demanda mundial de pescado, são necessárias medidas como a adoção de práticas de manejo e transporte adequados para que o produto final seja realmente de qualidade (Goes *et al.*, 2015). Práticas de manejo mesmo sendo bem conduzidas podem ser fontes causadoras de estresse, pois influenciam no equilíbrio metabólico dos animais, desencadeando respostas ao estresse, o que pode alterar a qualidade do produto final, pois acelera o processo do *rigor mortis* que acelera o processo de degradação (Mendes *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2016).

O estresse é definido como um conjunto de reações fisiológicas a um ou mais estímulos que ameaça a homeostase (Bojink *et al.*, 2016). Como resposta a situações de estresse podem ocorrer possíveis alterações fisiológicas como genéticas, proteicas, energéticas, imunológicas, endócrinas, neurais e comportamentais, podendo alterar a capacidade imunológica, o estresse também pode deixar o organismo susceptível a doenças e a morte. O estresse pode ser classificado em agudo e crônico, sendo o primeiro aquele de curto tempo como biometria, transporte, reprodução e aqueles ditos crônicos são de exposição prolongada como poluição (Tort, 2011).

A resposta ao estresse envolve mecanismos fisiológicos com possíveis alterações genéticas, proteicas, energéticas, imunológicas, endócrinas, neurais e até comportamentais para compensar os desequilíbrios gerados pelo agente estressor a fim de recuperar a homeostase. Por alterar a capacidade imunológica normal do organismo, o estresse também pode deixar o organismo susceptível a doenças e a morte (Tort, 2011; Santos *et al.*, 2016). A magnitude e a duração das respostas ao estresse dependem do tipo de agressor e do tempo e intensidade de exposição, podendo causar problemas no crescimento, desenvolvimento, reprodução, comportamento e resistência a doenças (Schreck *et al.*, 2016).

Um dos primeiros órgãos a entrar em contato direto com o agente estressor são as brânquias, fazendo destes um possível biomarcador de estresse (Paulino *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014). São a primeira linha de defesa e ainda estão envolvidas em vários processos

fisiológicos como respiração, excreção de resíduos nitrogenados, osmorregulação, equilíbrio ácido base, e produção hormonal (Beck e Peatman, 2015). De acordo com Cantanhêde *et al.* (2014), a qualidade da água e a poluição causam alterações nas brânquias como mecanismos de resposta, essas alterações podem comprometer a função primordial das brânquias. Agentes estressores agem nestes órgãos alterando a produção e composição de muco (Monteiro *et al.*, 2010), a densidade de células mucosas (Sveen *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017), e provocando processos inflamatório e lesões (Fiuza *et al.*, 2015).

Segundo Boijink *et al.* (2016), os agentes estressores também podem desencadear mudanças na difusão dos íons. Peixes de água doce tem mecanismo de regulação iônica, no entanto em situações de estresse alterações nos níveis de cortisol e catecolaminas aumentam a superfície branquial para uma maior captação de oxigênio aumentando a difusão de íons para o meio (Silva *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2017).

Segundo Alves *et al.* (2016) torna-se necessário a utilização de novas técnicas de manejo que visem o bem-estar animal, afim de minimizar o efeito do estresse sobre a qualidade do produto final. Há algumas décadas anestésicos utilizados na aquicultura estão sendo estudados, por serem um grupo de substâncias mitigadoras do estresse de manejo em peixes. Atua reduzindo o estresse do manuseio, transporte, e os níveis de amônia e efluxo de íons (Becker *et al.*, 2016; Sena *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Os anestésicos atuam no sistema nervoso diminuindo as respostas dos organismos ao estresse (Dos Santos *et al.*, 2017). A depressão do sistema nervoso central é dada pela ação nos axônios, causando a liberação de neurotransmissores ou aumentando a excitabilidade da membrana (Tavares-Dias, 2009).

Os anestésicos podem ser locais ou gerais e via brânquia, difundindo-se pelo sangue agem inibindo a transmissão de sinais neurais do sistema nervoso periférico para o central. Um dos possíveis mecanismos de ação dos anestésicos é pela potencialização do sistema GABAérgico (ácido gama-aminobutírico-neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central), pela modulação no sitio de benzodiazepina (BDZ) do receptor GABA_A. Pode também agir na modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem (Ross e Ross, 2008;). No entanto, o mecanismo de ação da maioria dos anestésicos ainda não foi elucidado (Baldisserotto *et al.*, 2017). Os anestésicos diferem em suas ações e afetam a função celular de diferentes maneiras (Rang *et al.*, 2016), dificultando assim o entendimento do mecanismo de ação de cada um, sendo necessário estudos sobre cada produto.

Alguns trabalhos têm confirmado o envolvimento do efeito anestésico com o sistema GABA em estudos com *Lippia alba* (Heldwein *et al.*, 2014), *Ocimum gratissimum* (Silva *et al.*, 2012), *Clibadium surinamense* (Costa *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2016), e verificado uma relação do eugenol, presente no óleo essencial de algumas plantas com ativação do receptor GABA_A (Sahin *et al.*, 2017). Porém esta relação com o sistema GABAérgico não foi visto para *Aloysia triphylla* e *Cymbopogon flexuosus* (Dos Santos *et al.*, 2017). Em anestésicos sintéticos como o MS-222 e a benzocaína foi comprovado o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem (Baldisserotto *et al.*, 2017).

No entanto, efeitos adversos a partir da utilização de anestésicos químicos têm sido reportados em peixes, como o aumento dos batimentos cardíacos e da respiração, acompanhado da elevação dos níveis de glicose no sangue (Zahl *et al.*, 2012). Embora o uso destes produtos na aquicultura seja uma boa alternativa para a diminuição das respostas dos peixes ao estresse, deve-se ter cautela em seu uso, uma vez que existem poucos estudos e estes podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis. Isso porque cada anestésico exige uma concentração diferente para atingir o estágio de anestesia desejado (Souza *et al.* 2015). Se usado de forma inadequada, concentração ou tempo de exposição elevados, podem tornar essas substâncias tóxicas para o peixe (Cunha *et al.*, 2017).

Diante disso, a toxicologia se apresenta como é uma ferramenta indispensável na avaliação de compostos em que os organismos aquáticos podem ser expostos (Américo-Pinheiro *et al.*, 2017). Sendo definida como a capacidade que uma substância tem de causar efeito danoso em um organismo (Costa *et al.*, 2008). Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crônicos. Em testes de toxicidade aguda, um organismo é exposto a várias concentrações de determinada substância para determinar a CL₅₀, que é a concentração letal, capaz de matar 50% dos animais testados, em um curto intervalo de tempo que varia de 24 a 96 horas (Klaassen e Watkins, 2012). Portanto, os testes de toxicidade podem auxiliar na definição de uma margem de confiança para o uso de anestésicos.

Os anestésicos sintéticos mais usados são a tricafina metano sulfonato (MS-222), a quinaldina (2-4 -metilquinolina), o fenoxietanol (2-fenoxietanol) e a benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato), sendo a benzocaína economicamente mais acessível (Santos *et al.*, 2016; Bolasina *et al.*, 2017; Correia *et al.*, 2017). O MS-222 é um dos poucos anestésicos com permissão para uso na aquicultura, mas não se encontra disponível para venda no Brasil, estimulando assim estudos que viabilizam produtos anestésicos alternativos (Saccol *et al.*,

2017b). Devido a estes fatores, há uma demanda crescente para produtos anestésicos de baixo custo, de fácil obtenção e possa oferecer segurança aos animais, aos manipuladores e ao ambiente (Correia *et al.*, 2017), concentrando as pesquisas em produtos naturais para substituir produtos sintéticos (Boijink *et al.*, 2016).

Além disso, o uso de anestésicos de origem natural é uma boa alternativa para aquicultura com bases agroecológicas, uma vez que a piscicultura orgânica é a criação de peixes sem a utilização de contaminantes ou poluentes, ou aditivos químicos artificiais, priorizando a conservação do ambiente, proteção dos consumidores e proibição de terapêuticos sintéticos ou produtos químicos (Boscolo *et al.*, 2012; Rebouça e Gomes, 2016). Desta forma a utilização de anestésicos de origem natural, com possíveis baixos níveis de toxicidade, viabilidade econômica, praticidade e eficácia no uso, apresenta-se como uma alternativa viável na redução de possíveis danos fisiológicos e bioquímicos (Cunha *et al.*, 2011).

A flora brasileira tem uma série de espécies com potencial de extração de óleo essencial (OE) que ainda não foi estudada. O OE pode ser fonte de moléculas com efeitos depressores no sistema nervoso central, tais quais anestésicos e sedativos (Garlet *et al.*, 2016). Propriedades fitoterápicas de óleos essenciais têm sido pesquisadas em diversos países devido à saúde humana e ambiental. O uso de extrativos vegetais, como óleos essenciais e derivados têm se mostrado promissor com efeitos anestésicos e sedativos na aquicultura, sendo o eugenol e o mentol os principais anestésicos naturais utilizados no Brasil (Barbas *et al.*, 2017; Baudisserotto *et al.*, 2017). Existem estudos sendo desenvolvidos com óleo essencial de plantas, como alfavaca (Ribeiro *et al.*, 2016), melaleuca, eucalipto (Rezende *et al.*, 2017), manjerição (Correia *et al.*, 2017), lavanda, sândalo (Matulovic *et al.*, 2015), poejo (Cunha *et al.*, 2017), citronela (Barbas *et al.*, 2017), açafraão e murta (Saccol *et al.*, 2017b).

Segundo Cascaes *et al.* (2015) os óleos essenciais de espécies de *Myrcia* são compostos por monoterpenos e sesquiterpenos. Sendo sesquiterpenos predominantemente mais abundantes para a espécie *M. sylvatica* (Silva *et al.*, 2016). São encontrados na literatura alguns estudos acerca dos potenciais farmacológicos de *M. sylvatica*, dentre eles, seu potencial fitopatogênico (Lustosa *et al.*, 2011), microbiano/antibacteriano (Silva *et al.*, 2016), composição química e toxicidade do óleo de *M. sylvatica* contra *Aedes aegypti* (Rosa *et al.*, 2016), anestésico/sedativo em tabaqui (Saccol *et al.*, 2017b) e matrinxã (Saccol *et al.*, 2017a), atenuante de alterações fisiológicas, moleculares e bioquímicas frente ao estresse do transporte

(Saccol *et al.*, 2018) e a descrição das propriedades do óleo essencial de *M. sylvatica* (Prado *et al.*, 2017).

Além do OE outros subprodutos também têm se mostrados promissores quanto ao seu potencial farmacológico. Por exemplo, o hidrolato, também conhecido como ‘águas florais’ ou ‘hidrossóis’, é um subproduto do processo de hidrodestilação que consiste de solução aquosa composta pela água proveniente da hidrodestilação e alguns componentes voláteis, e princípios ativos presentes no OE (Souza *et al.*, 2007).

Alguns autores avaliaram o potencial farmacológico desse tipo de extrativo vegetal. Como o potencial fungicida dos hidrolatos de *Helietta apiculata*, *Conyza canadenses* e *Cymbopogon nardus* (Franzener *et al.*, 2007), *Schinus terebinthifolius* (Santos *et al.*, 2014), *Cymbopogon citratus*, *Gallesia integrifolia*, *Coriandrum sativum*. Bibiano e Sáber (2017) estudaram a inibição de crescimento micelial pelo hidrolato de *Annona muricata*. Nascimento *et al.* (2009) testaram o efeito antihelmíntico *in vivo* do hidrolato de hortelã em bovinos infectados por nematóides gastrointestinais. Souza *et al.* (2017) verificaram o potencial alelopático do hidrolato de seis espécies do gênero *Croton*. Por outro lado, Riani *et al.* (2017) fizeram a caracterização química do hidrolato de *Piper chimonanthifolium*, indicando seus possíveis potenciais cosméticos e farmacológicos. Quanto ao potencial farmacológico na aquicultura, Silva *et al.* (2017) avaliaram o uso de hidrolato de *Lippia alba* em transporte simulado de tambaqui.

Com o constante crescimento da produção aquícola, e em paralelo as constantes situações de estresse decorrentes do manejo adotado, torna-se necessária a formulação de produtos de baixo custo, baixa toxicidade, praticidade no uso e de fácil acesso aos piscicultores que possa minimizar os danos decorrentes dessas situações. Os sedativos e anestésicos de origem natural surgem como uma opção, sendo estes ainda condizente com as diretrizes aplicadas ao mercado de produtos orgânicos, que inviabiliza o uso de produtos sintéticos. Podendo ser estes na forma de óleo, extratos, nanoemulsões, ou mesmo o hidrolato, que sendo um subproduto da extração do óleo tem sido descartado ao longo da produção do óleo.

Assim sendo, o presente trabalho vem contribuir com estudos sobre os produtos anestésicos alternativos a fim de minimizar efeitos de estresse decorrentes de práticas de manejo em sistemas de piscicultura intensiva. Sendo o hidrolato, um produto de origem vegetal, de fácil acesso e hidrossolúvel, torna-o econômico e ecologicamente viável uma vez que produtos

naturais apresentam possíveis baixos níveis de toxicidade sobre os organismos, o ambiente e os agentes envolvidos.

Esta dissertação foi organizada em forma de uma introdução geral, objetivos, um artigo científico que será submetido para a revista *Journal of Applied Ichthyology* (normas em anexo-A). As figuras e tabelas foram inseridas no corpo do texto para melhor compreensão das informações e visualização dos resultados. Sendo posteriormente formatado segundo as normas da revista. A dissertação está finalizada com o tópico considerações finais.

Objetivos

Geral

Avaliar o efeito anestésico ou sedativo e a toxicidade do Hidrolato de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Específicos

Verificar a eficácia, o tempo e a concentração necessária para a indução e recuperação anestésica de juvenis de tambaqui expostos ao hidrolato de *Myrcia sylvatica*;

Determinar a concentração letal em 96 horas (CL_{50-96h}) do Hidrolato de *M. sylvatica* em juvenis de tambaqui;

Avaliar os parâmetros físico-químicos da solução teste antes e após a introdução do Hidrolato de *M. sylvatica* para os testes de concentração letal (CL_{50-96h}) nas diferentes concentrações testadas em juvenis de tambaqui;

Identificar as concentrações de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ na solução teste em função das concentrações do Hidrolato de *M. sylvatica* utilizadas para a concentração letal (CL_{50-96h}) de juvenis de tambaqui;

Caracterizar a densidade de células mucosas branquiais em juvenis de tambaqui expostos aos testes de concentração letal (CL_{50-96h}) nas diferentes concentrações de Hidrolato de *M. sylvatica*.

Artigo

Toxicidade aguda e potencial anestésico do hidrolato de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Andria Simone Oliveira Valente^{1,2*}, Elen Monique de Oliveira Sousa^{1,2}, Raiane Caroline Sousa Silva^{1,3}, Jonas da Silva Costa^{1,2}, Sand Dara dos Santos Machado^{1,3}, Hugo Napoleão Pereira da Silva¹, Janna Laely dos Santos Maia¹, Rosa Helena Veras Mourão⁴, Lenise Vargas Flores da Silva^{1,2}

¹Laboratório de Química, Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Universidade Federal do Oeste do Pará;

²Programa de Pós-graduação em Recursos Aquáticos Continentais da Amazônia;

³Graduanda em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia das Águas. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC- CAPES- Pró Amazônia;

⁴Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Oeste do Pará;

Correspondente: L.V.F. Silva, Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas- Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil; E-mail: lvfrsi@yahoo.com.br/lenise.silva@ufopa.edu.br

Resumo

Práticas de manejo em piscicultura podem ser estressante para peixes. Alguns produtos anestésicos estão sendo utilizados como mitigadores de respostas ao estresse de manejo. Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial anestésico e a toxicidade aguda do hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS) em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Para o teste de anestesia foram utilizadas as concentrações 15, 20, 25, 30 e 35% de HMS diluído em água e um controle contendo somente água. Para determinar a Concentração Letal (CL_{50-96h}) foram utilizadas as concentrações 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% de HMS e controle água. Para ambos os testes foram utilizados 15 animais por tratamento. Foram feitas análises físico-químicas das soluções quanto a temperatura, pH, oxigênio

dissolvido, condutividade elétrica, alcalinidade, amônia total, Na^+ e K^+ e Cl^- antes e após o teste $\text{CL}_{50-96\text{h}}$. Foi determinado a densidade de células mucosas branquiais (DCM) após a exposição ao teste $\text{CL}_{50-96\text{h}}$. O tratamento de 30% HMS foi o mais efetivo para indução e recuperação anestésica em tambaquis. A $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ estimada foi de 11, 19% de HMS. Os parâmetros físico-químicos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, antes e após o teste $\text{CL}_{50-96\text{h}}$. Houve aumento no efluxo de íons e excreção de amônia dose dependente. A DCM diminuiu com o aumento da concentração de HMS. O uso deste produto mesmo em baixas concentrações para o manejo por tempo prolongado deve ser evitado. Sugere-se a continuidade de estudos a cerca da toxicidade do HMS.

Introdução

A produção aquícola está em constante crescimento, podendo chegar em 195,9 milhões de toneladas em 2025, um crescimento de 17% em relação a produção de 2013-2015 (FAO, 2016). No entanto, os procedimentos de manejo aquícola, como captura, biometria, reprodução e transporte são agentes estressores. Tem sido estimulado o uso de anestésicos para minimizar os efeitos e danos causados pelo estresse (Tavares-Dias & Mariano, 2015).

Os anestésicos sintéticos mais usados em peixes são a triclaína metano sulfonato (MS-222), a quinaldina (2-4 -metilquinolina), o fenoxietanol (2-fenoxietanol) e a benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato), sendo a benzocaína economicamente mais acessível (Bolasina *et al*, 2017; Correia *et al*, 2017; Santos *et al*, 2016). Contudo Zahl *et al*, (2012) mencionam efeitos adversos no uso destes produtos químicos e atrelados a necessidade de produtos de baixo custo, fácil acesso e segurança aos atores envolvidos, pesquisas estão sendo

desenvolvidas com produtos naturais para substituir produtos sintéticos (Correia *et al*, 2017; Boijink *et al*, 2016).

Os óleos essenciais (OE) de eugenol e o mentol são os anestésicos mais utilizados em estudos na aquicultura (Barbas *et al*, 2017; Baudisserotto *et al*, 2017), porém existem outros OE sendo testados como alfavaca (Ribeiro *et al*. 2016), melaleuca, eucalipto (Rezende *et al*, 2017), manjeriço (Correia *et al*, 2017), lavanda, sândalo (Matulovic *et al*, 2015), poejo (Cunha *et al*, 2017), citronela (Barbas *et al*, 2017), açafraão e murta (Saccol *et al*, 2017b).

Segundo Cascaes *et al*. (2015) os OE de espécies de *Myrcia* são compostos por monoterpenos e sesquiterpenos. Sendo sesquiterpenos predominantemente mais abundantes para a espécie *M. sylvatica* (Silva *et al*. 2016). Estudos recentes mostram seu potencial antinociceptivo e anti-inflamatório (Almeida 2014), fitopatogênico (Lustosa *et al*. 2011), microbiano/antibacteriano (Silva *et al*. 2016), e de toxicidade contra *Aedes aegypti* (Rosa *et al*. 2016). Saccol *et al*. (2018) avaliaram o potencial farmacológico do OE de *M. sylvatica* na aquicultura como mitigador de alterações fisiológicas, moleculares e bioquímicas frente ao estresse do transporte. Saccol *et al*. (2017a, 2017b) estudaram seu efeito anestésico/sedativo em matrinxã e em tambaqui.

Além do OE outros extrativos vegetais também têm se mostrados promissores quanto ao seu potencial farmacológico. Por exemplo, o hidrolato, também conhecido como ‘águas florais’, consiste da solução aquosa condensada proveniente da hidrodestilação e alguns componentes volatéis, compostos aromáticos e princípios ativos presentes no OE (Souza *et al*. 2007; Souza *et al*. 2017). Foi avaliado o potencial antifúngico, antibacteriano e indutor da produção de fitoalexinas dos hidrolatos de *Helietta apiculata*, *Conyza*

canadensis e *Cymbopogon nardus* em plantas (Franzener *et al.*, 2007). O potencial fungicida do hidrolato de aroeira foi testado contra antracnose de goiabeira por Santos *et al.* (2014). Nascimento *et al.* (2009) testou o efeito anti-helmíntico do hidrolato de hortelã contra nematóides gastrointestinais em bovinos. Avaliou-se o potencial alelopático do hidrolato de espécies do gênero *Croton* na germinação de diásporos de alface e tomate (Souza *et al.* (2017). Bibiano e Sáber (2017) estudaram a inibição de crescimento micelial de fungos fitopatogênicos pelo hidrolato de *Annona muricata*. Contudo, somente um trabalho foi encontrado com aplicação de hidrolato na aquicultura, onde Silva *et al.* (2017) avaliou o uso de hidrolato de *Lippia alba* em transporte simulado de tambaqui.

Diante do exposto, torna-se necessária a formulação de produtos para minimizar o estresse no manejo, que sejam de baixo custo, baixa toxicidade, efetividade, praticidade no uso, de fácil acesso aos piscicultores e seguro aos agentes envolvidos. Sedativos e anestésicos de origem natural surgem como uma opção, sendo estes ainda condizente com as diretrizes aplicadas ao mercado de produtos orgânicos, que inviabiliza o uso de produtos sintéticos, estimulando estudos com hidrolato na aquicultura, por ser um subproduto, geralmente descartado, de fácil acesso e hidrossolúvel. E sendo o tambaqui (*Colossoma macropomum*), a espécie mais cultivada na América do Sul, possui grande potencial para aquicultura, principalmente na região Norte do Brasil (Rebelatto Junior *et al.*, 2015). É a espécie nativa mais cultivada na Região Amazônica, um peixe de hábito alimentar onívoro-oportunista alta produtividade e rusticidade, suporta, variações nos parâmetros físico-químicos da água, vem aumentando o interesse pelo cultivo dessa espécie (Gomes *et al.* 2010; Rodrigues, 2014; Santos *et al.* 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anestésico e a toxicidade aguda do hidrolato de *M. sylvatica* (HMS) em juvenis de tambaqui, e verificar o efeito sobre a morfofisiologia branquial (densidade de células mucosas) e o fluxo iônico.

Material e Métodos

Material Vegetal

A parte aérea da espécie de *M. sylvatica* foi coletada as margens da Rodovia Everaldo Martins-PA 457, km 21 na comunidade de Santa Rosa (S 02°30'46.4' W 054°50'93.1'), Santarém, Pará, Brasil. A coleta de dados foi realizada pela manhã (entre 7h30 e 8h30), em maio de 2016. Um espécime de voucher foi depositado no Herbário da EMBRAPA Amazônia Oriental, Cidade de Belém, estado do Pará, Brasil, sob o número IAN 184696.

Extração do hidrolato

O material vegetal (folhas frescas) de *M. sylvatica* foi desfolhado, alocado em sacos de papel, colocado para secagem em estufa (40°C) por um período de 72 horas, e triturado. O hidrolato foi obtido pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparato tipo Clevenger, com 3 horas de duração para o processamento. Foi utilizado 960 gramas de material vegetal para a obtenção de 6 litros de hidrolato. O hidrolato coletado foi armazenado em freezer a 2°C até a realização do experimento anestésico.

Após a extração do hidrolato, foi feita a partição líquido/líquido com hexano, e posteriormente foi realizada a caracterização química por meio de cromatografia gasosa (cromatógrafo Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System, acoplado a um detector seletivo de massa Agilent Technologies MSD 5973). Sendo analisado por meio da comparação de espectros de massa com bibliotecas referências (Adams, 2006; Mondello, 2011; Nist, 2011) no programa GCMS Prostrun Analysis.

Procedimento Experimental

Os experimentos e a obtenção dos juvenis ocorreram na Estação de produção de Peixes UAGRO-Santa Rosa/-SEDAP- Santarém-Brasil.

Para realização dos testes de indução anestésica foram utilizados juvenis de tambaqui de 3-5cm de comprimento ($1,1 \pm 0,38$ g), que foram aclimatados em tanques continuamente aerados, e mantidos em jejum por 24 horas. Posteriormente, para a observação da indução anestésica, os peixes foram acondicionados, individualmente, em recipientes contendo 500 mL da solução - água com adição do HMS em diferentes concentrações (15, 20, 25, 30 e 35%). As concentrações anestésicas foram escolhidas com base em testes preliminares pelos quais foram avaliadas diversas concentrações do HMS diluído em água. Para cada tratamento foram submetidos 15 animais (n total = 75). Então foi determinado o tempo de indução anestésica (em segundos) com tempo máximo de observação de 30 minutos, conforme protocolo de Small (2003) adaptado seguindo os estágios: estágio 1 - sedação leve, diminuição da reatividade para estímulos externos; estágio 2 - sedação profunda, perda parcial de equilíbrio e nado errático; estágio 3 - anestesia, perda total do equilíbrio e da locomoção; e estágio 4 - colapso medular. No entanto, este último estágio não foi observado. Posteriormente os animais foram transferidos para um recipiente com 1L de água livre de anestésico para determinar o tempo de recuperação, onde se considerou recuperado quando apresentava nado normal e reação a estímulos externos normal (Saccol *et al*, 2017b).

Para determinação da CL_{50-96h} de HMS para juvenis de tambaqui foi utilizado o sistema de condução de teste estático, sem substituição ou sifonagem de água, fotoperíodo de 12 horas, aeração constante e sem alimentação durante o período de 96 horas de exposição ao anestésico. Foram avaliadas as concentrações de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15% (hidrolato

diluído em água), e os controles contendo somente água (CA), com 3 repetições por tratamento. O recipiente com capacidade útil de 1L, e com densidade de cinco juvenis perfazendo um total de 90 juvenis (15 para cada tratamento). A cada 24 horas foi observada a sobrevivência, quanto ao comportamento (presença de reflexos, natação e equilíbrio na coluna de água, surgimento de protusão labial, observação da existência de muco corporal e mortalidade) e aferido as variáveis físico-químicas da água como oxigênio dissolvido (oxímetro Lovibond- Senso Direct 150), temperatura, pH e condutividade elétrica (multiparâmetro ExStik II EC500). Foram coletadas amostras das soluções antes e após o teste para verificação da alcalinidade (Boyd & Turker, 1992), amônia total (pelo método do salicilato-hipoclorito de acordo com Verdouw; Van Echteld & Dekkers (1978)) e não ionizada (Colt & Tomasso, 2002). O fluxo líquido de íons Na^+ , K^+ e Cl^- foi calculado de acordo com Gonzalez *et al.* (1998).

Análise histológica e densidade de células mucosas branquiais

Após a exposição ao teste $\text{CL}_{50-96\text{h}}$, os animais que sobreviveram foram anestesiados com eugenol e eutanasiados por secção medular, foram então fixados inteiros em solução de Bouin (por 24h), lavados em álcool 50% e armazenados em álcool 70% com amostragem de 5 peixes/tratamento/repetição. Posteriormente foi feita a dissecção dos arcos branquiais para o processamento histológico padrão em parafina. Foram feitos 5 cortes/animal em perfil sagital com espessura de $5\mu\text{m}$ em micrótomo marca Leipzig. Para coloração das lâminas utilizou-se os corantes Alcian blue – pH 2,5 (coloração de células mucosas ácidas) e Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS+) (coloração de células mucosas neutras). A contagem destas células foi feita com o auxílio de um microscópio óptico equipado com sistema de captura de imagem (Zeiss/Axio Cam Erc 51) e programa

de medidas interativas (Image-PRO PLUS) obtendo-se assim a densidade de células estimadas em mm².

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os resultados dos tempos de indução e recuperação anestésica, fluxo de íons e a densidade de células mucosas, foram submetidos a análise de variância (ANOVA- One Way). Em seguida foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias, através do software SigmaPlot v. 11. Foi realizada uma análise de regressão para a avaliação da dose-resposta da relação entre a concentração do hidrolato e os tempos de anestesia pelo software Statística 8.

Para determinação da CL_{50-96h} do HMS foi utilizada a análise de probitos por meio do software SPSS (Versão 16).

Resultados

Caracterização química do Hidrolato

Foi analisado o hidrolato e o OE de *M. sylvatica* que apresentaram sesquiterpenos como constituintes majoritários, tendo grande similaridade entre a composição do OE e HMS. Os constituintes majoritários destes compostos estão apresentados na tabela 1. O OE e o HMS apresentaram os mesmos constituintes majoritários, diferindo apenas nas concentrações.

Tabela 1 Constituintes majoritários do óleo essencial (OEMS) e hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS), analisado pela comparação do índice de retenção de Kovats calculado (IRcalc) e da literatura (IRref), sendo TR o tempo de retenção do constituinte.

| TR | Constituintes majoritários | OEMS (%) | HMS (%) | IR calc | IRref |
|-------|----------------------------|----------|---------|---------|-------|
| 28.37 | Beta Selineno | 14.88 | 12.81 | 1489 | 1489 |
| 29.69 | Trans Calameneno | 13.83 | 11.16 | 1526 | 1521 |
| 30.62 | Alfa Calacoreno | 11.02 | 9.78 | 1542 | 1544 |
| 32.16 | Óxido de Cariofileno | 6.45 | 3.51 | 1585 | 1582 |
| 33.95 | 1 Epi Cubenol | 2.99 | 3.32 | 1630 | 1627 |
| 35.80 | Cadaleno | 4.29 | 4.67 | 1677 | 1675 |
| 35.83 | Mustakone | 2.39 | 2.57 | 1680 | 1676 |

Indução e recuperação anestésica

Não houve mortalidade durante o experimento de anestesia. Houve diminuição do tempo de anestesia com o aumento na concentração anestésica (Figura 1).

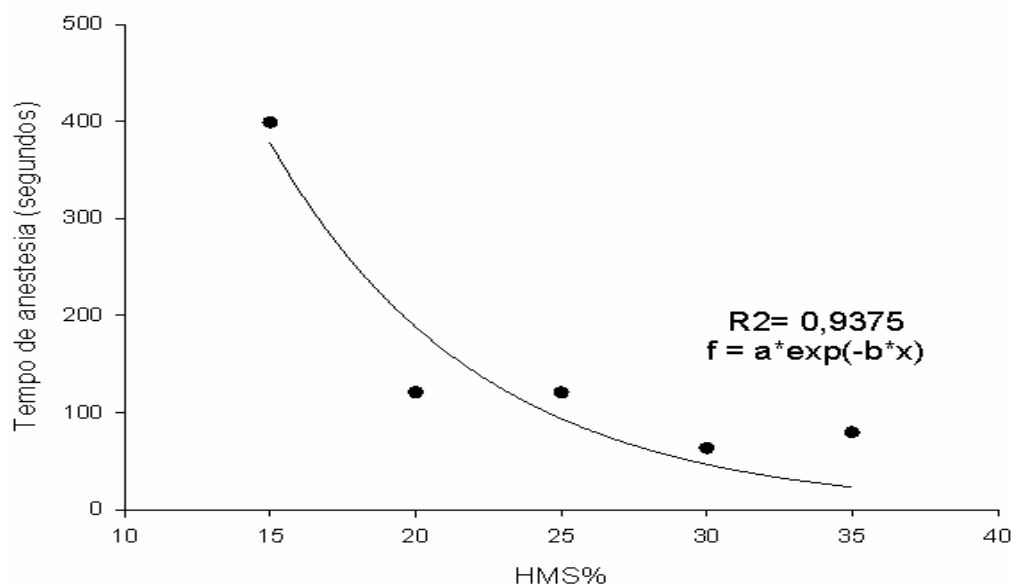


Figura 1. Tempo de indução anestésica dos juvenis de tambaqui expostos a diferentes concentrações de hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS).

As concentrações acima de 20% mostraram bons tempos de indução e recuperação anestésica inferior a 3 e 5 minutos, respectivamente. Sendo 30% a concentração que apresentou o menor tempo de indução e recuperação anestésica ($63,45 \pm 9,07$ e $71,57 \pm 12,35$ segundos) (Tabela 2).

Tabela 2– Tempo de indução e recuperação anestésicas (em segundos) com Hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS) em Juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes concentrações na água.

| Concentração (%) | Estágios anestésicos (segundos) | | | Recuperação (s) |
|------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | Estágio 1 | Estágio 2 | Estágio 3 | |
| HMS 15% | 43,42±12,45 ^a | 93,45±36,96 ^a | 399,00±51,53 ^a | 147,40±28,51 ^a |
| HMS 20% | 38,36±11,16 ^a | 55,75±10,81 ^b | 120,91±25,88 ^b | 100,68±41,47 ^b |
| HMS 25% | 20,18±7,76 ^b | 30,00±7,66 ^c | 120,80±16,67 ^b | 119,22±44,43 ^{ab} |
| HMS 30% | 19,42±3,26 ^b | 27,79±6,81 ^c | 63,45±9,07 ^c | 71,57±12,35 ^b |
| HMS 35% | 11,70±3,02 ^b | 16,08±4,01 ^c | 79,80±9,19 ^c | 222,90±33,19 ^c |

Letra minúscula diferença significativa entre linhas da mesma coluna; ANOVA ONE WAY, $p < 0.05$ teste de Tukey.

Toxicidade aguda (CL_{50-96h})

Nas primeiras horas de exposição houve aumento de excretas e excitabilidade. Após 72 horas de exposição foi observado comportamento canibal. Não houve mortalidade nas concentrações abaixo de 10% no teste de CL_{50-96h}. Nas primeiras 24 horas morreram todos os animais expostos a HMS 15%, e 3 animais do tratamento 12,5%, que mostrou 100% de mortalidade até 48 horas (Tabela 3), resultando em uma CL_{50-96h} estimada de 11,19% de HMS (Figura 2).

Tabela 3 Mortalidade de juvenis de tambaqui expostos a CL_{50-96h} com hidrolato de *Myrcia sylvatica*

| HMS(%) | Mortalidade | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|
| | 24h | 48h | 72h | 96h |
| C.A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7,5% | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10% | 0 | 5 | 0 | 0 |
| 12,5% | 12 | 15 | 15 | 15 |
| 15% | 15 | 15 | 15 | 15 |

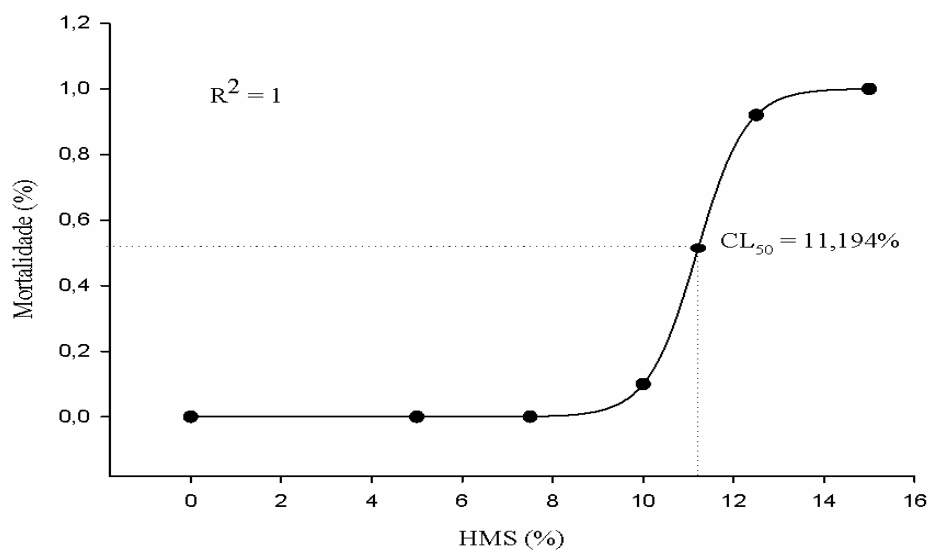


Figura 2 Toxicidade aguda (CL_{50-96h}) do hidrolato de *Myrcia sylvatica* em juvenis de tambaqui (*Collossoma macropomum*).

Parâmetros físico-químicos da água e fluxo iônico

Os parâmetros físico químicos da solução pura de HMS foi: 25,8°C (temperatura), 4,97 (pH), 41,1 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ (condutividade elétrica), 4,9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (oxigênio dissolvido). Não foi observado diferença significativa entre as variáveis físico-químicas água dos tratamentos (água +HMS) antes e após o teste CL_{50-96h}. Os valores das variáveis físico-químicas observadas (temperatura-°C, pH, oxigênio dissolvido- $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, condutividade elétrica- $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ e alcalinidade- $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3) antes e depois do teste foram, respectivamente (antes/depois): 26,53±0,51/27,06±0,21 (°C), 6,85±0,31/7,54±0,13 (pH), 6,43±0,59/6,88±0,53 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 127,68±10,02 /164,05±14,12 ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) e 16,74±2,76 /43,82±0,92 de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3 .

Ocorreu um aumento no efluxo dos íons Na^+ (HMS 5 e 7,5%) e Cl^- (7,5 e 10%), e na excreção de amônia (total e não-ionizada para todos os tratamentos) durante o teste toxicológico nos tratamentos com HMS quando comparado com o controle. Quanto ao

K⁺ não houve diferença significativa entre o efluxo dos tratamentos CA e com HMS

(Tabela 4).

Tabela 4 Fluxo iônico de sódio (Na⁺), cloreto (Cl⁻) e potássio (K⁺) e excreção de amônia total (NH₄⁺ + NH₃) e amônia não-ionizada (NH₃)

| | Na ⁺ μmol.L.kg ⁻¹ .h ⁻¹ | Cl ⁻ μmol.L.kg ⁻¹ .h ⁻¹ | K ⁺ μmol.L.kg ⁻¹ .h ⁻¹ | (NH ₄ ⁺ + NH ₃) Mg.L ⁻¹ | (NH ₃) Mg.L ⁻¹ |
|----------|---|---|--|---|--|
| C.A | -648,80±207,50 ^a | -1055,8±246,83 ^a | -74,58±17,20 ^a | 0,98±0,01 ^a | 0,0172±0,01 ^a |
| HMS 5% | -1197,3±188,37 ^b | -1861,21±316,58 ^a | -74,28±23,39 ^a | 1,71±0,16 ^b | 0,0432±0,00 ^b |
| HMS 7,5% | -1532,67±9,40 ^b | -5264,74±375,22 ^b | -110,49±6,95 ^{ab} | 2,14±0,18 ^c | 0,0491±0,00 ^b |
| HMS 10% | -836,86±28,21 ^a | -5194,44±327,81 ^b | -64,45±15,73 ^{ac} | 1,84±0,01 ^{bc} | 0,0461±0,00 ^b |

Letra minúscula diferença significativa entre tratamento (linhas). ANOVA ONE WAY, teste de Tukey (p<0,05).

Densidade de células mucosas branquiais

A densidade de células mucosas neutras (CMN) foi maior que o de células mucosas ácidas (CMA) (Figura 3). A densidade de todos os tipos de células mucosas branquiais diminuiu com o aumento da concentração do hidrolato, havendo diferença significativa entre todos os tratamentos em relação ao controle água (Tabela 5).

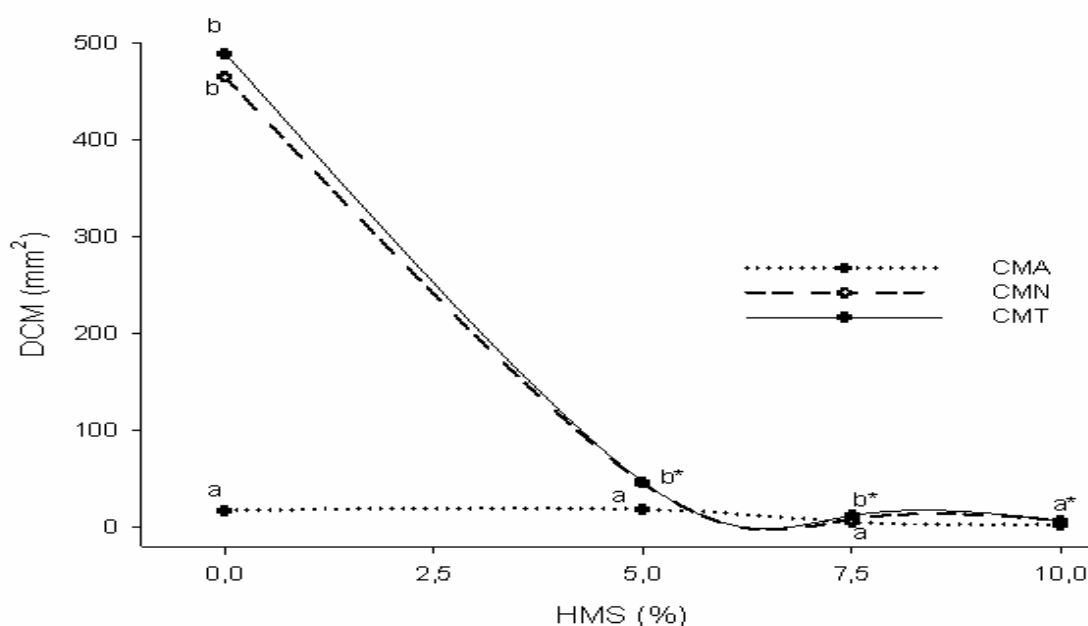


Figura 3– Densidade de células mucosas ácidas (CMA), neutras (CMN) e totais (CMT) (mm²) em juvenis de tambaqui expostos aos tratamentos controle (C.A) e diferentes concentrações de hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS). Letra minúscula diferença significativa entre tipos de células; ANOVA TWO WAY, p<0.05 teste de Tukey.

Tabela 5– Densidade de células mucosas ácidas (CMA), neutras (CMN) e totais (DCM) (mm²) em juvenis de tabaqui expostos aos tratamentos controle (C.A) e diferentes concentrações de hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS).

| Tratamentos | CMA | CMN | CMT |
|-------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C.A | 13,71±2,32 ^a | 515,50±69,35 ^a | 545,90±46,95 ^a |
| HMS 5% | 12,12±0,65 ^a | 91,30±11,95 ^b | 60,23±10,06 ^b |
| HMS 7,5% | 2,33±0,94 ^b | 8,88±1,34 ^c | 12,55±2,85 ^c |
| HMS 10% | 0,70±0,27 ^b | 7,77±3,34 ^c | 9,58±2,36 ^c |

Letra minúscula diferença significativa entre linhas da mesma coluna; ANOVA ONE WAY, p<0.05 teste de Tukey.

Discussão

A maioria dos compostos químicos encontrados no OE e HMS foram do tipo sesquiterpenos, corroborando com os trabalhos de Cascaes *et al* (2015), Saccol *et al* (2018) e Silva *et al* (2017). Os constituintes majoritários do HMS encontrados neste trabalho (beta selineno (12,81%), trans calameneno (11,16%), alfa calacoreno (9,78%) e cadaleno (4,67%)) são similar aos apresentados em estudos com OE de *M. sylvatica* (Prado *et al*, 2017; Saccol *et al*, 2017b; Saccol *et al*, 2018; Silva *et al*, 2016). Os constituintes majoritários encontrados no hidrolato foram os mesmos encontrados no OE, evidenciando o potencial farmacológico do produto.

Estudos recentes mostram o potencial farmacológico do óleo de *M. sylvatica* na aquicultura. Saccol *et al* (2017b) observaram seu efeito anestésico e antioxidante, sendo confirmado posteriormente e indicado para uso em manejo de transporte por melhorar o bem-estar animal, pois se mostrou atenuante em resposta ao estresse (Saccol *et al*, 2017a e 2018).

Neste trabalho foi observada uma relação negativa entre a concentração de hidrolato e o tempo de anestesia em praticamente todos os estágios anestésicos, ou seja, quando se aumentou a concentração do hidrolato, diminuiu o tempo necessário para indução anestésica assim como descrito por Saccol *et al*, (2017b) ao estudar o efeito anestésico do OE desta mesma planta. Um padrão semelhante foi visto em relação a recuperação diferindo apenas a partir da concentração de 30%. Segundo Ross & Ross (2008) o tempo de recuperação deveria aumentar conforme se aumenta a concentração anestésica. Todas as concentrações testadas induziram ao estágio 3 de anestesia. No entanto, se considera a concentração anestésica do HMS mais efetiva a de 30% com tempo de anestesia ($63,45 \pm 9,07$ segundos) e recuperação ($71,57 \pm 12,35$ segundos), estando essas abaixo do tempo considerados ideal (3 e 5 minutos para anestesia e recuperação, respectivamente). Portanto, mostrou-se um bom anestésico de acordo com os padrões indicados (Ross & Ross, 2008). O HMS apresentou tempo de indução e recuperação menores de que os obtidos nas melhores concentrações do OE testados em tabaqui, matrinxã e jundiá (Saccol *et al*, 2017a; 2017b; 2018). Sugerindo um forte efeito farmacológico na considerada “água condensada geralmente de descarte após a extração do OE” (hidrolato).

No teste de toxicidade, juvenis de tabaqui foram expostos a diferentes concentrações de HMS (5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15%) por um período de 96hs para determinar a concentração letal a 50% da população exposta. A CL_{50} estimada do HMS foi 11,19%. Após o contato com o anestésico foi observado aumento na excreção dos animais. Nas primeiras 24 horas os animais dos tratamentos acima de 10% tombaram. Todos os animais expostos as concentrações de 12,5 e 15% morreram nas primeiras 48 horas. No entanto, os animais do tratamento 10% se recuperaram, sugerindo que o produto tenha

volatilizado. A partir do terceiro dia de exposição os peixes apresentaram comportamento canibal, chegando até a morte, não foi encontrado na literatura informações sobre canibalismo em tambaqui. Para um manejo prolongado as concentrações acima de 11.19% podem ser letais, o que não inviabiliza o uso do HMS como anestésico na concentração sugerida de 30% pois esta concentração mostrou-se segura não apresentando nenhuma mortalidade durante ou após os testes de anestesia, considerando-se manejos rápidos (cerca de 3 minutos). No entanto para manejos prolongados, de acordo com a CL_{50-96h} , não se recomenda o uso do HMS em concentrações acima de 11,19%.

As variáveis físico-químicas da água (temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) antes e após o teste de toxicidade aguda, se mantiveram dentro da faixa considerada ideal para piscicultura (Arana, 2010; Faria *et al*, 2013; Leira *et al*, 2017; Sá, 2012; Silva *et al*, 2013), sugerindo que essas variáveis não influenciaram nos resultados obtidos de fluxo iônico, excreção de amônia e na DCM. O estresse pode alterar a difusão iônica entre o meio interno e externo em peixes (Silva *et al.*, 2015).

Neste estudo foi observado o aumento do efluxo de íons (Na^+ e Cl^-) e amônia total e não ionizada com o aumento da concentração de HMS na maioria dos tratamentos, indicando que este produto pode causar estresse osmorregulatório. Situações de estresse podem aumentar a difusão de íons para o meio, e o uso de OE como anestésico diminui o efluxo de íons e a excreção de amônia (Becker *et al*, 2016; Cunha *et al*, 2017). Silva *et al.* (2017) obteve diminuição no efluxo de íons, redução na excreção de amônia e da proliferação de células mucosas com o uso de hidrolato de *Lippia alba* em tambaqui.

Contudo o uso de HMS aumentou o efluxo de íons e também os níveis de amônia total e amônia não-ionizada, diferindo do observado por outros autores que mostram que o uso de anestésico diminui a amônia não-ionizada (Sena *et al.*, 2016), sugerindo que este

anestésico, nas concentrações testadas, pode ser um estressor adicional. Segundo Cunha *et al.* (2017), os anestésicos podem agir como estressores podendo provocar desequilíbrio osmótico. Apesar disto os valores de amônia total e NH_3 mantiveram-se dentro do considerado ideal (Leira *et al.*, 2017).

A proliferação de CM branquais pode ser uma resposta ao estresse. Pois, aumenta-se a taxa de produção de muco que atua como um filtro a fim de agregar uma maior quantidade de substâncias tóxicas (Rezende *et al.*, 2013). O aumento no número e densidade de células mucosas inibe a perda de água quando o peixe está fora da água e a perda iônica quando ele está na água (Moron *et al.*, 2009). Neste trabalho a DCM indicou uma relação negativa entre a concentração de HMS e a densidade dessas células. Outro fator interessante é que a densidade de CMN foi bem superior ao de CMA. Sendo que as CMN são glicoproteínas de baixa viscosidade e atuam lubrificando e protegendo o epitélio branquial contra danos físicos, enquanto que as CMA são glicoproteínas com alta viscosidade atuam aumentando a adesão a material particulado na água, atraem uma maior quantidade de íons da osmorregulação, e evitam a proliferação de microorganismos. A diminuição de muco ácido reduz o gradiente iônico próximo ao epitélio favorecendo a perda de íons (Moron *et al.*, 2009). Corroborando os resultados encontrados no presente trabalho, onde a densidade de CMA mostrou-se muito baixa e conseqüentemente houve aumento do efluxo de íons comparados ao controle água, o que difere de trabalhos que mostram o efeito mitigador de anestésico sobre a perda iônica.

O uso do HMS surge como uma alternativa mitigadora de estresse decorrente de manejo em aquicultura, pois mostrou efeito anestésico nas concentrações testadas e não apresentou morte de nenhum dos animais submetidos ao teste, o que dá uma margem de confiança na utilização do produto. Este é um subproduto da produção do óleo essencial,

geralmente descartado, podendo ter um rendimento muito superior ao óleo e apresentando os mesmos constituintes majoritário, com a vantagem de ser uma substância hidrossolúvel em água, o que facilita o seu uso na aquicultura pois não é necessário a diluição em álcool como os óleos essenciais. Surge também como uma alternativa no campo da agroecologia, uma vez que este é um produto de origem natural e pode substituir produtos sintéticos que não são permitidos por este setor.

Conclusão

O HMS 30% pode ser indicado como anestésico em tambaqui para manejos rápidos (cerca de 3 minutos) por promover indução anestésica em cerca de 1 minuto e sua recuperação em menos de 2 minutos. A CL_{50-96} estimada foi de 11,19% de hidrolato diluído em água. No teste de toxicidade aguda em 96 horas, este produto reduziu a densidade de células mucosas em todos os tratamentos testados. No entanto, causou estresse osmorregulatório elevando a perda de íons e amônia com o aumento da concentração do hidrolato, sugerindo que este pode ser um agente estressor dependendo do tempo de exposição. Portanto, considera-se restritivo o uso do HMS em tempos prolongados mesmo em baixas concentrações (5-10%). Sugere-se a manutenção de estudos acerca da toxicidade desse produto a níveis plasmáticos e celulares. Além de pesquisas sobre a segurança do uso (manipuladores, organismos alvo e ambiente), volatilidade do composto, e seu tempo de prateleira, pois são escassas as informações sobre esse tipo de extrativos alternativos em organismos aquáticos.

Agradecimento

A CAPES-Pró-Amazônia- Brasil pelo financiamento; a secretaria de Desenvolvimento. Agropecuário da Pesca do estado do Pará- SEDAP pelo apoio logístico para os

experimentos. A CAPES pela bolsa de estudo. Ao LabBBEx e Laboratório de Química Multiusuário-ICTA-UFOPA pelo apoio as análises.

Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Pará, sob o registro nº 042-2012 (Anexo B).

Referências

- Adams, R.P. 2006. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, EUA.
- Arana, V. L. 2010. *Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas*. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis. 62pp.
- Baldisserotto, B; Gomes, L.C; Heinzmann, B.M; Cunha, M.A. 2017. Farmacologia aplicada à aquicultura. Santa Maria, RS: Ed.UFSM. 656p.
- Barbas, L.A.L; Hamoy, M; Mello, V.J; Barbosa, R.P.M; Lima, H.S.T; Torres, M.F; Nascimento, L.A.S; da Silva, J.K.R; Andrade, E.H.A; Gomes, M.R.F. 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: a new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*. 479:60-68, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>
- Becker, A.G., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Salbego, J., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., Loro, V.L., Heinzmann, B.M. e Baldisserotto, B., 2016. Pre-sedation and transport of in water containing essential oil of *Rhamdia quelen* *Lippia alba*: metabolic and physiological response. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, no. 1, pp. 73-81. PMID:26297516. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-015-0118-x>.
- Bibiano, H.S; Sáber, M.L. 2017. Extratos de *Cymbopogon citratus* e *Annona muricata* como inibidores do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. *Revista Agrogeoambiental*, Pouso Alegre, v. 9, n. 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v9n22017978>.
- Boijink, C.L; Queiroz, C.A; Chagas, E.C; Chaves, F.C.M; Inoue, L.A.K.A. 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*)

- essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 457, pp. 24-28.
- Bolasina, S.N; de Azevedo, A; Petry, A.C. 2017. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivípara*. *Aquaculture Reports* 6. Pp. 56–60.
- Boyd, C.E.; Tucker, C.S. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, 1992. 183 p.
- Cascaes, M.M; Guilhon, G.M.S.P; Andrade, E.HA; Zoghbi, M.G.B. and Santos, L.S. 2015. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, p 23881- 23904.
- Correia, A.M; Pedrazzani, A. S; Mendonça, R. C; Massucatto, A; Ozório, R. A; Tsuzukia, M. Y. 2017. Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). *Brazilian Journal of Biology*. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.166695>.
- Colt, J. E., & Tomasso, J. R. (2002). Hatchery water supply and treatment. In G. A. Wedemeyer (Ed.), *Fish hatchery management*. Seattle, WA: American Fisheries Society.
- Cunha, J.A; Scheeren, C.A; Salbego, J; Gressler, L.t; Madaloz, L.M; Bandeira Junior, G; Bianchini, A.E; Pinheiro, C.G; Bordignon, S.A.L; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B. 2017. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotropical Ichthyology*, v.15, e160076.
- FAO. 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.
- Faria, R.H.S., Morais, M., Soranna, M.R.G.S., Sallum, W.B., 2013. *Manual de Criação de peixes em viveiros*, Brasília.
- Franzener, G., Martinez-Franzener, A. S., Stangarlin, J. R., Czepak, M. P., Schwan-Estrata, K. R. F., & Cruz, M. E. S. 2007. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina*, 28(1), 29–38

- Gomes, L.D.C.; Simões, L.N.; Araújo-lima, C.A.R.M. 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*), p. 175-204. In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.D.C. (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. v.2. Editora UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- 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. *Physiological and Biochemical Zoology*, 71, 15–22.
- Leira, M.H; da Cunha, L.T; Braz, M.S; Melo, C.C.V; Botelho, H.A; Reghim, L.S. 2017. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. *PUBVET. Medicina veterinária e zootecnia*. v.11, n.1, p.11-17.
- Lustosa, D. C; Bernardes, V. P; Vieira, T. A.; Andrade, D. I. M. 2011. Uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos de espécies florestais. *Cadernos de Agroecologia*. Vol 6, No. 2.
- Matulovic, F.M; Oshiro, L.M.Y. 2015. Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 13:57-68.
- Mondello, L. 2011. *FFNSC 2: Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds, Mass Spectral Database*. John Wiley & Sons Inc.
- Moron, S.E.A; Fernandes, C.A; Narciso, M. 2009. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerhythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology*, v.7, p. 491-498.
- Nascimento, E.M; Furlong, J; Pimenta, D.S; Prata, M.C.A. 2009. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. *Ciência Rural*, 39(3):817-824.
- NIST - National Institute of Standards and Technology: mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). Gaithersburg, MD: The NIST Mass Spectrometry Data Center, 2011.
- Prado, A.S; Leal, L.A; de Brito, P.P; Fonseca, A.L.A; Blawid, S; Ceschin, A.M; Mourão, R.H.V; da Silva Júnior, A.Q; da Silva Filho, D.A; Ribeiro Junior, L.A; da Cunha, W.F. 2017. *J Mol Model* 23:196/1–9. DOI 10.1007/s00894-017-3365-1.

- Rebelatto Junior, I.A; Lima, A.F; Prysthon, A; Rosa, D.K; Pinho, M.S; Flores, R.M.V; Soares, S.S. 2015. Levantamento da atuação da Embrapa em pesquisa, desenvolvimento e transferência de tecnologia nas áreas de pesca e aquicultura—Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 296 p
- Rezende, F.P; Pascoal, L.M; Vianna, R.A; Lanna, E.A.T. 2017. Sedation of Nile tilapia with essential oils: tea tree, clove, eucalyptus, and mint oils. *Rev. Caatinga, Mossoró*, v. 30, n. 2, p. 479 – 486.
- Rezende, K.F.O.; Santos, R.M.; Santos, R.M.; Shimada, J.C.B.; Silva, J.R.M.C.; Muniz, C.A.S.D. 2013. Histopatologia das brânquias de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, provenientes da represa Billings, área de proteção ambiental Bororé-Colônia. *Atas de Saúde Ambiental - ASA*, v.1, n.1, p.57-68.
- Ribeiro, A.S; Batista, E.S; Dairiki, J.K; Chaves, F.C.M. & Inoue, L.A.K.A. 2016. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. *Acta Scientiarum. Animal Sciences. Maringá*, v. 38, n. 1, p. 1-7.
- Rodrigues, A.P.O. 2014. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 40(1): 135 – 145.
- Rosa, C.S.; Veras, K.S.; Silva, P.R.; Lopes Neto, J.J.; Cardoso, H.L.M.; Alves, L.P.L.; Brito, M.C.A.; Amaral, F.M.M.; Maia, J.G.S.; Monteiro, O.S.; Moraes, D.F.C. 2016. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Rev. bras. plantas med*;18(1):19-26.
- Ross, L.G.; Ross, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Blacwell Publishing, Oxford-UK*. 222 pp.
- Saccol, E.M.H; Jerez-Cepa, I; Ourique, G.M; Pês, T.S; Gressler, L.T; Mourão, R.H.V; Martínez-Rodríguez, G; Mancera, J.M; Baldisserotto, B; Pavanato, M.A; Martos-Sitcha, J.A. 2018. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. *Research in Veterinary Science* 117. pp.150–160.
- Saccol, E.M.H., Londero, E.P., Bressan, C.A., Salbego, J., Gressler, L.T., Silva, L.V.F., Mourão, R.H.V., Oliveira, R.B., Llesuy, S.F., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2017a. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized

- and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. *Vet. Anaesth. Analg.* 44, 555–566.
- Saccol, E.M.H., Toni, C., Pês, T.S., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Silva, L.V.F., Mourão, R.H.V., Oliveira, R.B., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2017b. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquac. Res.* 48 (5), 2012–2031.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S. 2006. *Peixes Comerciais de Manaus*. Pró Várzea, Manaus, Amazonas. 144 pp.
- Santos, M.C; de Oliveira Junior, G.L.F.G; Oliveira, L.F.M; Carvalho, C.R.D; Gagliardi, P.R. 2014. Perfil volátil e potencial fungitóxico do hidrolato e extrato de sementes e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 2, p. 284-289.
- Santos, V.A; Santos, P.R.B; Malcher, C.S; Lourenço, C.B; Trindade, G.V; Souza, R.A.L. 2016. Indução anestésica do extrato aquoso de cunambí, *Clibadium surinamense* linn para a realização de biometrias em tambaquis, *Colossoma macropomum*. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.17, n.2, p.291-298
- Sena, A. C; Teixeira, R.R; Ferreira, E.L; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B; Caron, B.O; Schmidt, D; Couto, R.D; Copatti, C.E. 2016. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture* (Amsterdam), v. 465, p. 374-379.
- Silva, A.D.R., Santos, R.B., Bruno, A.M.S.S., Soares, E.C., 2013. Cultivo de tambaqui em canais de abastecimento sob diferentes densidades de peixes. *Acta Amazônica* 4, 517-524. doi:10.1590/S0044-59672013000400014
- Silva, H.N.P; Sousa, E.M.O; Maia, J.L.S; Pinheiro, M.T.L; Lameirão, S.V.O.C; Mourão, R.H.V; Maia, J.G.S; Baldisserotto, B; Silva, L.V.F.S. 2017. *Lippia alba* (Verbenaceae) hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. *Aquac Res*;00:1–7.
- Silva, L.A; Sarrazin, S.L.F; Oliveira, R.B; Suemitsu, C; Maia, J.G.S; Mourão, R.H.V. 2016. Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants.* 13(3): 1-9.

- Silva, L.L.; Garlet, Q.I; Koakoski, G; Oliveira, T.A; Barcelos, L.G; Baldisserotto, B; Pereira, A.M.S; Heinzman, B.M. 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Rev. Bras. Plant. Med.*, 17. pp. 215-22.
- Souza, G.S; Bonilla, O.H; Chaves, B.E; de Lucena, E.M.P; Silva, C. de S. 2017. Potencial alelopático de seis espécies do gênero *Croton* L. na germinação de alface e tomate. *Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre*, 72(2):155-160. DOI 10.21826/2446-8231201772201
- Souza, K.S., Chaar, J.S., Oliveira, K.M.T., Gomes, E.O., Portela, C.N., Pohlit, A.M., Quihnard, E.L.J., Nunomura, S.M., Tadei, W.P., Mouchrek Filho, V.E., Silva, D.D., Galhiane, M.S. & Chierice, G.O. 2007. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai Botucatu*, v.9, n.2, p.1-7.
- Small, B.C. 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218 (1): 177–185.
- Tavares-Dias, M & Mariano, W.S. 2015. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. [Vol. 1]. São Carlos: Pedro & João Editores, 429p.
- Verdouw, H, van Echteld, C., & Dekkers, E. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12, 399–402.
- Zahl, I.H.; Samuelsen, O.B.; Kiessling, A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem*, 38: 201-218.

Considerações Finais

O uso de produtos naturais na aquicultura vem sendo amplamente estudado, e várias plantas têm-se por estudar em uma região tão rica em biodiversidade como a Amazônia. No entanto, a maior parte dos estudos estão voltados para a utilização do óleo essencial, podendo ser ampliado para outros tipos de extrativos vegetais. O hidrolato, por exemplo, é um subproduto da extração do óleo e, geralmente, é descartado. No entanto, este produto tem sua constituição química semelhante à do OE da planta de origem, contendo assim, possivelmente, as mesmas propriedades farmacológicas. Contudo, torna-se necessário a realização de estudos a fim de esclarecer lacunas sobre esse produto, uma vez que este é pouquíssimo estudado e pouco se sabe sobre seu potencial, volatilidade, tempo de prateleira, toxicidade aos organismos e ao ambiente.

Neste trabalho foi confirmado o potencial anestésico do HMS como mitigador de estresse em juvenis de tambaqui, no entanto, em tempo prolongado ele causa estresse osmorregulatório e uma relação interessante de diminuição de células mucosas apesar do aumento do efluxo de íons e amônia. Evidenciando o potencial promissor desse produto como anestésico (até 3-5 min) e não se recomenda o uso para procedimentos longos. Com isso, recomenda-se a continuação de estudos com uso de hidrolato de outras plantas na produção animal.

Referências Bibliográficas

- Alves, A.R; Figueiredo Júnior, J.P.; Santana, M.H.M.; Andrade, M.V.M.; Lima, J.B.A.; Pinto, L.S.; Ribeiro, L.M. 2016. Efeito do estresse sobre a qualidade de produtos de origem animal. Revista PUBVET.v.10, n.6, p.448-459.
- Américo-Pinheiro, J.H.P; Torres, N.H; Ferreira, L.F.R. 2017. Protistas ciliados e seu potencial uso como indicadores de qualidade de água. Revista científica ANAP Brasil. V.10, n.18.
- Baldisserotto, B; Gomes, L.C; Heinzmann, B.M; Cunha, M.A. 2017. Farmacologia aplicada à aquicultura. Santa Maria, RS: Ed.UFSM. 656p.
- Barbas, L.A.L; Hamoy, M; Mello, V.J; Barbosa, R.P.M; Lima, H.S.T; Torres, M.F; Nascimento, L.A.S; da Silva, J.K.R; Andrade, E.H.A; Gomes, M.R.F. 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: a new anaesthetic for use in fish. Aquaculture. 479:60-68, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>.
- Beck, B. H. & Peatman, E. 2015. in Mucosal health in aquaculture 1st edn (eds Beck B. H. & Peatman E.) Ch. 1, 1–2.
- Becker, A.G., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Salbego, J., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., Loro, V.L., Heinzmann, B.M. and Baldisserotto, B., 2016. Pre-sedation and transport of in water containing essential oil of *Rhamdia quelen* *Lippia alba*: metabolic and physiological response. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 42, no. 1, pp. 73-81
- Bibiano, H.S; Sáber, M.L. 2017. Extratos de *Cymbopogon citratus* e *Annona muricata* como inibidores do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Revista Agrogeoambiental, Pouso Alegre, v. 9, n. 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v9n22017978>
- Boijink, C.L; Queiroz, C.A; Chagas, E.C; Chaves, F.C.M; Inoue, L.A.K.A. 2016. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquaculture, 457, pp. 24-28.
- Bolasina, S.N; de Azevedo, A; Petry, A.C. 2017. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivípara*. Aquaculture Reports 6. Pp. 56–60.
- Boscolo, W.R; Feiden, A.; Neu, D.H; Dieterich, F. 2012. Sistema orgânico de produção de pescado de água doce. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., Salvador, v.13, n.2, p.578-590.
- Cantanhêde, S.M.; Medeiros, A.M.; Ferreira, J.R.C.; Alves, L.M.C.; Ferreira, F.S.; Cutrim, M.V.J.; Santos, D.M.S. 2014. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias

- de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís—MA. *Arq. Bra. Med. Vet. Zootec*, 66, 593–601
- Cascaes, M.M; Guilhon, G.M.S.P; Andrade, E.HA; Zoghbi, M.G.B. and Santos, L.S. 2015. Constituents and Pharmacological Activities of Myrcia (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, p 23881- 23904.
- Correia, A.M; Pedrazzani, A. S; Mendonça, R. C; Massucatto, A; Ozório, R. A; Tsuzukia, M. Y. 2017. Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). *Brazilian Journal of Biology*. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.166695>
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R. & Espindola, E. L. G. 2008. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Quim. Nova*, 31: 1820
- Costa, E.A.; Rocha, F.F.; Torres, M.L.B.; Souccar, C.; Lima, T.C.M. de; Lapa, A.J.; Lima-Landman, M.T.R. 2006. Behavioral effects of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamense* L (Asteraceae). *Neurotoxicology and Teratology*, v.28, n.3, p.349-353.
- Cunha, J.A; Scheeren, C.A; Salbego, J; Gressler, L.t; Madaloz, L.M; Bandeira Junior, G; Bianchini, A.E; Pinheiro, C.G; Bordignon, S.A.L; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B. 2017. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotropical Ichthyology*, v.15, e160076.
- Dos Santos, A.C; Junior, G.B; Zago D.C; Zeppenfeld, C.C; Da Silva, D.T; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B; Da Cunha, M.A. 2017. Anesthesia and anesthetic action mechanism of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Cymbopogon flexuosus* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet Anaesth Analg* 44: 106-113
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- Fiuza, T.S; Silva, P.C; Paula, J.R; Tresvenzol, L.M.F; Ferreira, H.D; Sabóia-Morais, S.M.T. 2015. Effect of the crude ethanol extract and fractions of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley on the gills of *Oreochromis niloticus* L. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 15, pp. 1-8
- Franzener, G., Martinez-Franzener, A. S., Stangarlin, J. R., Czepak, M. P., Schwan-Estrata, K. R. F., & Cruz, M. E. S. 2007. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina*, 28(1), 29–38
- Garlet, Q.I.; Pires, L.C.; Silva, D.T.; Spall, S.; Gressler, L.T.; Bürger, M.E.; Baldisserotto, B.; Heinzmann, B.M. 2016. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2016) 49(1): e4872.

- Goes GA, Oliva RA, Ronqui RG, Queiroz TR, Satolo EG. 2015. Descrição do sistema logístico de transporte: uma análise conceitual envolvendo piscicultura. *South American Development Society Journal*. Mai/Ago;1(2):100-115.
- Heldwein, C.G.; de Silva, L.L.; Gai, E.Z.; Roman, C.; Parodi, T.V.; Bürger, M.E.; Baldisserotto, B.; Flores, É.M.; Heinzmann, B.M. 2014. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: Sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Anaesth. Analg.* 41, 621–629
- Klaassen, C.D.; Watkins, J.B. 2012. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 72p.
- Lustosa, D. C; Bernardes, V. P; Vieira, T. A.; Andrade, D. I. M. 2011. Uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos de espécies florestais. *Cadernos de Agroecologia*. Vol 6, No. 2.
- Matulovic, F.M; Oshiro, L.M.Y. 2015. Uso de óleos essenciais como anestésico para manejo de camarões marinhos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 13:57-68.
- Mendes, J.M.; Inoue, L.A.K.A.; Jesus, R.S. 2015. Influência do estresse causado pelo transporte e método de abate sobre o rigor mortis do tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Brazilian Journal of Food Technology*, v.18, n.2, p.162-169.
- Miranda, A.D.L; Delvaux Júnior, N.A; Aiura, F.S; Aiura, A.L.O; Maciel, M.P; Arouca, C.L.C. 2016. Extrato de tingui na conservação da tilápia-do-Nilo. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.17, n.4, p.763-771.
- Monteiro, S.M; Fontainhas-Fernandes, A; Sousa, M. 2010. An immunohistochemical study of gill epithelium cells in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Folia Histochem. Cytobiol.* 48(1): 112-121.
- Nascimento, E.M; Furlong, J; Pimenta, D.S; Prata, M.C.A. 2009. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. *Ciência Rural*, 39(3):817-824.
- Paulino M.G., Sakuragui M.M., Fernandes M.N. 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 86: 1-7.
- Prado, A.S; Leal, L.A; de Brito, P.P; Fonseca, A.L.A; Blawid, S; Ceschin, A.M; Mourão, R.H.V; da Silva Júnior, A.Q; da Silva Filho, D.A; Ribeiro Junior, L.A; da Cunha, W.F. 2017. *J Mol Model* 23:196/1–9. DOI 10.1007/s00894-017-3365-1
- Rang, H.P; Ritter, J.M; Flower, R.J; Henderson, G. 2016. Rang & Dale: farmacologia - 8. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 1939p.

- Rebouças, L.O.S e Gomes, R.B. 2016. Aquicultura orgânica: uma visão geral. *Rev. Bras. Eng. Pesca* 9(2): p. 135-151.
- Rezende, F.P; Pascoal, L.M; Vianna, R.A; Lanna, E.A.T. 2017. Sedation of Nile tilapia with essential oils: tea tree, clove, eucalyptus, and mint oils. *Rev. Caatinga, Mossoró*, v. 30, n. 2, p. 479 – 486.
- Riani, L. R.; Macedo, A. L.; Chedier, L. M.; Pimenta, D. S. Chemical. 2017. Analysis of Essential Oil and Hydrolates of Leaves, Inflorescences and Stems of *Piper chimonanthifolium Kunth*. *Rev. Virtual Quim.*, 2017, 9 (4), 1560-1569. DOI: 10.21577/1984-6835.20170091
- Ribeiro, A,S; Batista, E.S; Dairiki, J.K; Chaves, F.C.M. & Inoue, L.A.K.A. 2016. Anesthetic properties of *Ocimum gratissimum* essential oil for juvenile matrinxã. *Acta Scientiarum. Animal Sciences. Maringá*, v. 38, n. 1, p. 1-7.
- Rosa, C.S.; Veras, K.S.; Silva, P.R.; Lopes Neto, J.J.; Cardoso, H.L.M.; Alves, L.P.L.; Brito, M.C.A.; Amaral, F.M.M.; Maia, J.G.S.; Monteiro, O.S.; Moraes, D.F.C. 2016. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Rev. bras. plantas med*;18(1):19-26.
- Ross, L.G.; Ross, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blacwell Publishing, Oxford-UK. 222 pp.
- Saccol, E.M.H; Jerez-Cepa, I; Ourique, G.M; Pês, T.S; Gressler, L.T; Mourão, R.H.V; Martínez-Rodríguez, G; Mancera, J.M; Baldisserotto, B; Pavanato, M.A; Martos-Sitcha, J.A. 2018. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. *Research in Veterinary Science* 117. pp.150–160.
- Saccol, E.M.H., Londero, E.P., Bressan, C.A., Salbego, J., Gressler, L.T., Silva, L.V.F., Mourão, R.H.V., Oliveira, R.B., Llesuy, S.F., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2017a. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. *Vet. Anaesth. Analg.* 44, 555–566.
- Saccol, E.M.H., Toni, C., Pês, T.S., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Silva, L.V.F., Mourão, R.H.V., Oliveira, R.B., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2017b. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquac. Res.* 48 (5), 2012–2031.
- Sahin, S; Eulenburg, V; Heinlein, A; Villmann, C; Pischetsrieder, M. 2017. Identification of eugenol as the major determinant of GABA_A-receptor activation by aqueous *Syzygium aromaticum* L. (clove buds) extract. *Journal of Functional Foods.* V 37. P 641-649.

- Santos, D.M.S; Melo, M.R.S; Mendes, D.C.S; Rocha, I.K.B;S; Silva, J.P.L; Cantanhêde, S.M; Meletti, P.C. 2014. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *Int J Environ Res Public Health* 11:12927–12937.
- Santos, M.C; de Oliveira Junior, G.L.F.G; Oliveira, L.F.M; Carvalho, C.R.D; Gagliardi, P.R. 2014. Perfil volátil e potencial fungitóxico do hidrolato e extrato de sementes e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 2, p. 284-289.
- Santos, V.A; Santos, P.R.B; Malcher, C.S; Lourenço, C.B; Trindade, G.V; Souza, R.A.L. 2016. Indução anestésica do extrato aquoso de cunambí, *Clibadium surinamense* linn para a realização de biometrias em tambaquis, *Colossoma macropomum*. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.17, n.2, p.291-298
- Schreck, C.B; Tort, L; Farrell, A.P; Brauner, C.J. 2016. *Biology of stress in fish*. Vol. 35. New York: Academic Press. p. 405-62.
- Sena, A. C; Teixeira, R.R; Ferreira, E.L; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B; Caron, B.O; Schmidt, D; Couto, R.D; Copatti, C.E. 2016. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture (Amsterdam)*, v. 465, p. 374-379.
- Silva, H.N.P; Sousa, E.M.O; Maia, J.L.S; Pinheiro, M.T.L; Lameirão, S.V.O.C; Mourão, R.H.V; Maia, J.G.S; Baldisserotto, B; Silva, L.V.F.S. 2017. *Lippia alba* (Verbenaceae) hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. *Aquac Res*; 00:1–7.
- Silva, L.A; Sarrazin, S.L.F; Oliveira, R.B; Suemitsu, C; Maia, J.G.S; Mourão, R.H.V. 2016. Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants*. 13(3): 1-9.
- Silva, L.L; Parodi, T.V; Reckziegel, P; Garcia, V.O; Bürger, M.E; Baldisserotto, B; *et al.* 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 350-353: 91-97, doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.012.
- Silva, L.L; Garlet, Q.I; Koakoski, G; Oliveira, T.A; Barcelos, L.G; Baldisserotto, B; Pereira, A.M.S; Heinzman, B.M. 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Rev. Bras. Plant. Med.*, 17. pp. 215-22.

- Souza, G.S; Bonilla, O.H; Chaves, B.E; de Lucena, E.M.P; Silva, C. de S. 2017. Potencial alelopático de seis espécies do gênero *Croton* L. na germinação de alface e tomate. *Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre*, 72(2):155-160. DOI 10.21826/2446-8231201772201
- Souza, K.S., Chaar, J.S., Oliveira, K.M.T., Gomes, E.O., Portela, C.N., Pohlit, A.M., Quihnard, E.L.J., Nunomura, S.M., Tadei, W.P., Mouchrek Filho, V.E., Silva, D.D., Galhiane, M.S. & Chierice, G.O. 2007. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais Botucatu*, v.9, n.2, p.1-7.
- Souza, R. L. M; Vettorazzi, M. B; Kobayashi, R. K; Neto, M. A. A. F. 2015. Eugenol como anestésico no manejo de ariacó, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758), cultivado. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, n. 3, p. 532-538.
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Torgersen, J. S., Ytteborg, E., Jørgensen, S. M., Handeland, S; Stefansson, S.O; Nilsen, T.O; Calabrese, S; Ebbesson, L; Terjesen, B.F; Takle, H. 2016. Impact of fish density and specific water flow on skin properties in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture*, 464, 629–637.
- Tavares-Dias, M. 2009. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. 1ªed. Brasil: Embrapa Amapá, Amapá.
- Tort, I. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology.*, 35, pp. 1366-1375.
- Zahl, I.H.; Samuelsen, O.B.; Kiessling, A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem*, 38: 201-218.

Anexo-A

Normas para submissão de artigo para revista *Journal of applied ichthyology*. Esta revista possui o fator de impacto 1,376 e qualis-CAPES B1 na área de biodiversidade.

Author Guidelines

Journal of Applied Ichthyology has now adopted ScholarOne Manuscripts, for online manuscript submission and peer review. The new system brings with it a whole host of benefits including:

- Quick and easy submission
- Administration centralised and reduced
- Significant decrease in peer review times

From now on **all** submissions to the journal must be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jai>. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you require assistance then click the **Help** link which appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page. If you have any queries, please contact the Editorial. Office: JAIjournal@wiley.com.

This journal is published in an online-only format.

Sections

1. [Submission](#)
2. [Aims and Scope](#)
3. [Manuscript Categories and Requirements](#)
4. [Preparing Your Submission](#)
5. [Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
6. [Author Licensing](#)
7. [Publication Process After Acceptance](#)
8. [Post Publication](#)
9. [Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Thank you for your interest in the *Journal of Applied Ichthyology*. Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jai>. The submission system will prompt authors to use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish their work from that of other researchers. [Click here](#) to find out more. [Click here](#) for more details on how to use [ScholarOne](#). For help with submissions, please contact the Editorial Office: JAIjournal@wiley.com. We look forward to your submission.

2. AIMS AND SCOPE

The *Journal of Applied Ichthyology* publishes articles of international repute on ichthyology, aquaculture, and marine fisheries; ichthyopathology and ichthyoimmunology; environmental toxicology using fishes as test organisms; basic research on fishery management; and aspects of integrated coastal zone management in relation to fisheries and aquaculture. Emphasis is placed on the application of scientific research findings, while special consideration is given to ichthyological problems occurring in developing countries.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

All submissions should have continuous line numbers. All tables, figures, supporting information and bibliographic entries must have a reference in the text. Tables should be included in the main document after the reference list, each on an individual page alongside their legend. Figures should not be included in the main document and should instead be uploaded as individual files. Character limit includes tables, figure/table legends and references, and excludes spaces.

i. Original Articles. *Manuscript structure:* Summary (400 words max); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Tables; List of figure captions; List of supporting information legends. Character limit: 30,000 characters (20 pages).

ii. Review Articles. *Manuscript structure:* Summary (400 words max); Introduction; Suitable headings; Acknowledgements; References; Tables; List of figure captions; List of supporting information legends. Character limit: 37,000 characters (25 pages).

iii. Short Communication. *Manuscript structure:* Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Tables; List of figure captions; List of supporting information legends. Character limit: 9000 characters (6 pages).

iv. Technical Contribution. *Manuscript structure:* Summary (250 words max); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Tables; List of figure captions; List of supporting information legends. Character limit: 15,000 characters (10 pages).

v. Surgeon Paper. *Manuscript structure:* Summary (400 words max); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Tables; List of figure captions; List of supporting information legends. Character limit: 30,000 characters (20 pages).

vi. Supplement Article. *Manuscript structure:* No specific word limit or structure. However papers should include tables and a list of figure captions after the reference list.

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Cover Letters-Cover letters are not mandatory however may be supplied at the author's discretion.

Parts of the Manuscript-The manuscript should be submitted in separate files: main text file including title page and tables; figures; supplementary/supporting files.

Main Text File-The text file should be presented in the following order:

- i. Title
- ii. A short running title of less than 50 characters
- iii. The full names of the authors
- iv. The author's institutional affiliations where the work was carried out, with a footnote for the author's present address if different from where the work was carried out. The corresponding author should be identified here also.
- v. Acknowledgements
- vi. Main text (structured according to Section 3)
- vii. References
- viii. Tables (each on an separate page with title and footnotes if necessary)
- ix. Figure legends
- x. Appendices (if relevant). Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Title: The title should be a short informative title that contains the major key words related to the content. The title should not contain abbreviations (see Wiley's best practice SEO tips).

Authorship: For details on eligibility for author listing, please refer to the journal's Authorship policy outlined in the Editorial Policies and Ethical Considerations section.

Acknowledgments: Contributions from individuals who do not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section.

Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement: Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. See ‘Conflict of Interest’ section in Editorial Policies and Ethical Considerations for details on what to include in this section. Authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Main text

See Section 3: Manuscript categories and requirements for information on manuscript types, structure, word limit and other requirements. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

References

References should be prepared according to the *Publication Manual of the American Psychological Association* (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper. All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list. A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the APA FAQ. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:10.1176/appi.ajp.159.3.483

Book

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>. While authors are responsible for the accuracy of the references, submissions are not required to reflect the precise reference formatting of the journal (use of italics, bold etc.), however it is important that all key elements of each reference are included.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Please convey essential information within the first 60 characters of the legend. The table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive - the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. [Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Figures submitted in colour will be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if a reader chooses to print them in black and white.

Additional Files

Appendices-Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information-Supporting information is information that is not essential to the article but that provides greater depth and background. It is hosted online, and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information. Note: if data, scripts or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI-units wherever possible. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website at <http://www.bipm.fr/> for more information about SI units. If other units cannot be avoided, these should be defined at first mention.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Editing, Translation and Formatting Support: [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting and figure preparation, Wiley Editing Services ensure that the manuscript is ready for submission.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Editorial Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements. Papers that do not meet these requirements may be rejected without review. The journal operates a single-blind peer review process. Wiley's policy on confidentiality of the review process is [available here](#).

Data storage and documentation

The *Journal of Applied Ichthyology* encourages data sharing wherever possible, unless this is prevented by ethical, privacy or confidentiality matters. Authors publishing in the journal are therefore encouraged to make their data, scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper available via a publicly available data repository, however this is not mandatory. If the study includes original data, at least one author must confirm that he or she had full access to all the data in the study, and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors are encouraged to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE reporting guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry.

Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
- European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Clinical Trial Registration: The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines: Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are encouraged to adhere to the research reporting standards provided by the EQUATOR Network, e.g. for systematic reviews and meta-analyses, observational studies, and many more.

Species Names: Upon its first use in the title, summary and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature: Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession- number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'.

Addresses are as follows:

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

EMBL Nucleotide Sequence Submissions <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu

SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest: The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding: Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://support.crossref.org/hc/en-us/articles/214360886-The-Open-Funder-Registry>.

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional authorship options: Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. ‘X and Y should be considered joint first author’ or ‘X and Y should be considered joint senior author.’

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the *Journal of Applied Ichthyology* encourages the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. [Find more information here.](#)

Publication Ethics: This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read our Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found at <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>.

6. AUTHOR LICENSING

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper. Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License. General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please [click here](#).)

Self-Archiving definitions and policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please [click here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: Authors who choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production: When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

Proofs: Once the paper is typeset the author will receive an email notification with the URL to download a PDF typeset page proof, associated forms and full instructions on how to correct and return the file.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process - authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Publication Charges

Colour figures: Colour figures are published online free of charge.

Page charges: The author will be notified of the cost of any page charges when they receive the proofs, along with instructions on how to pay for the charges.

Early View: The journal offers rapid publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When your article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to your article.

To find out how best to promote an article, click [here](#).

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For any queries or issues, please contact the Editorial Office: JAI.journal@wiley.com.

Anexo B



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CAMPUS XII - SANTARÉM



PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Sr(a). Pesquisador(a).

O projeto “Produtos naturais como anestésicos em peixes da região oeste do Pará: Caracterização de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e sensoriais ” Nº 042-2012, sob a responsabilidade do (a) Pesquisador(a) Orientador(a) Prof^a. Dr^a Lenise Vargas Flores da Silva , foi APROVADO pelo CEP em reunião de 27/06/2012.

Santarém, 27 de junho de 2012.

Prof. Msc. André dos Santos Cabral
Coord. CEP/UEPA-STM
Portaria 36/07-CCBS

Prof. Msc. André dos Santos Cabral
Coordenador do Comitê de Ética/UEPA/Campus XII/STM