



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

**USO DO HIDROLATO DE *Myrcia sylvatica* (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE)
COMO SEDATIVO EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE TRANSPORTE DE
JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

JONAS DA SILVA COSTA

Santarém, Pará
Junho de 2018

JONAS DA SILVA COSTA

USO DO HIDROLATO DE *Myrcia sylvatica* (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE)
COMO SEDATIVO EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE TRANSPORTE DE
JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Orientadora: 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
Junho de 2018

JONAS DA SILVA COSTA

USO DO HIDROLATO DE *Myrcia sylvatica* (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE)
COMO SEDATIVO EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE TRANSPORTE DE
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.

Aprovado em: 25 de Maio de 2018.



Profa. Dra. Lenise Vargas Flores da Silva (Orientadora - Presidente)



Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira (ICED/UFOPA)



Prof. Dr. Luciano Jensen Vaz (ICTA/UFOPA)



Prof. Dr. Frank Raynner Vasconcelos Ribeiro (PPGRACAM/UFOPA)

**Santarém, Pará
Junho de 2018**

Sinopse:

Realizou-se o transporte simulado de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) para avaliação da sobrevivência, parâmetros fisiológicos e histológicos, considerando a adição de hidrolato *Myrcia sylvatica* na água como possível substância sedativa.

Palavras-chaves: sobrevivência, qualidade da água, fluxo iônico e células mucosas.

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

C837u Costa, Jonas da Silva
Uso do hidrolato de *Myrcia sylvatica* (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE) como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). / Jonas da Silva Costa. – Santarém, 2018.
50 fls.: il.
Inclui bibliografias.

Orientadora: 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. Sobrevivência. 2. Qualidade da água. 3. Fluxo iônico. I. Silva, Lenise Vargas Flores da, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 639.2

*Dedico este trabalho aos meus pais **Gerlane Costa** e **Artur dos Anjos**, por todos os ensinamentos e educação expressados na formação de meu caráter e todo o incentivo durante as dificuldades da vida. Ao meu querido filho **Gael Costa**, meus irmãos **Aline** e **Marcos Vinícius** pelo companheirismo, amor e carinho. Em especial a Deus por todas as conquistas alcançadas*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas, que me abençoou e me amparou mesmo nos momentos mais difíceis e por ter colocado pessoas certas nas horas certas.

A minha orientadora professora Dra. Lenise Vargas Flores da Silva pela dedicação, atenção, confiança e paciência comigo, minha enorme gratidão e admiração.

A Unidade Agropecuária UAGRO-Santa Rosa/-SEDAP- Santarém pelo apoio logístico e disponibilidade dos juvenis para este trabalho. Em especial ao Sr. Zacarias de Oliveira e sua excelente 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 análise química do hidrolato de *Myrcia sylvatica*, e da colaboração de sua equipe (Adenilson Barroso, Antonio Jr e Dayane Sena).

Aos colegas de trabalho, em especial ao Hugo Napoleão pela amizade, parceria e enorme contribuição na realização dos experimentos e auxílio na análise estatística e aos demais parceiros de laboratório (Simone, Elen Monique, Sand Machado e Raiane) pelo auxílio durante as atividades do período experimental e principalmente nas análises de água e nos procedimentos histológicos.

Aos colegas de turma, pelos grandes momentos que estivemos juntos nas disciplinas com aulas teóricas e práticas, aulas de inglês em especial as colegas Cida, Silvana e Elizabeth pelo enorme apoio.

Aos Professores Frank Raynner, Ricardo Bezerra e Luciano Vaz por aceitarem compor a banca examinadora e pelas enormes contribuições para melhoria do presente trabalho.

Aos familiares, professores e amigos que auxiliaram direta e indiretamente para a realização desse sonho. Que Deus abençoe cada um de vocês.

Desde já obrigado imensamente a todos!

Resumo

A utilização de produtos de origem natural na aquicultura vem intensificando, como alternativa para melhoria na produção de peixes através do uso como suplementos alimentares, inseticidas, anestésicos e sedativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do Hidrolato *Myrcia sylvatica* (HMS), em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes densidades de carga. Juvenis de tambaqui (entre 3 a 5 cm) foram colocados em sacos plásticos para transporte simulado de 17h nas densidades de carga de 30, 60 e 90 juvenis/L em três concentrações de HMS (2.5, 5 e 7.5%) e controle água (C.A). Foi verificada a sobrevivência logo após o transporte e após 24h (caracterizado como pós-transporte). Os parâmetros físicos e químicos da água foram avaliados antes e após o transporte (temperatura, pH, alcalinidade, dureza, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos), bem como calculado o fluxo líquido dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e excreção de amônia. Além disso, foi observada a densidade de células mucosas branquiais após o transporte. Não houve diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos e densidades. A temperatura, dureza, amônia total e não ionizada não mostraram diferença significativa entre os tratamentos e densidade. Já o pH apresentou diferença mesmo no valores iniciais, reduzindo em função do aumento da concentração de HMS. O oxigênio dissolvido foi significativamente menor quando se comparou os valores iniciais e finais. A alcalinidade e sólidos totais dissolvidos aumentaram significativamente em função da densidade. A condutividade e fluxo iônico (Na^+ , K^+ e Cl^-) foram menores no tratamento com 5% de HMS principalmente na maior densidade. O número de células mucosas brânquias neutras e ácidas foi menor em 5% de HMS na maior densidade de carga. O uso do HMS na concentração de 5% pode ser recomendado para transporte de juvenis de tambaqui de longa duração 17h. Apesar de não diferir significativamente do grupo controle no percentual de sobrevivência, todavia apresentou baixas oscilações nos valores de pH em todas as densidades de carga e na densidade de 90 peixes/L reduziu o efluxo dos íons de Na^+ e K^+ e Cl^- , e não estimulou a produção de células mucosas branquiais neutras e ácidas, com isso mostrou-se um potencial redutor de estresse e eficaz nas maiores densidades. Este trabalho é o primeiro estudo com o uso de hidrolato de *Myrcia sylvatica* com aplicação em manejo na aquicultura.

Palavras-chaves: sobrevivência, transporte, densidade, hidrolato

Abstract

The use of natural products in aquaculture has been intensifying, appearing as an alternative for improvement in production as food supplements, insecticides, anesthetics and sedatives. The objective of this work was to evaluate the use of the *Myrcia sylvatica* hydrolate (HMS) under simulated conditions of transport of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles at different densities. Tambaqui juveniles (3 to 5 cm) were placed in plastic bags. For a 17 h simulated transport at loading densities of 30, 60 and 90 juveniles/L in three concentrations of HMS (2.5, 5 and 7.5%) and control water (CA). Survival was verified immediately after transport and after 24h (characterized as post-transport). The physical and chemical parameters of the water were evaluated before and after the transport (temperature, pH, alkalinity, hardness, dissolved oxygen, electrical conductivity and total dissolved solids), as well as the net flow of Na^+ , K^+ , Cl^- ions and excretion of ammonia. In addition, the density of gill mucous cells was observed after transport. There was no significant difference in survival between treatments and densities. Temperature, hardness, total and non - ionized ammonia showed no significant difference between treatments and density. However, the pH presented a difference even at the initial values, reducing as a function of the increase in HMS concentration. The dissolved oxygen was significantly lower when the initial and final values were compared. Alkalinity and total dissolved solids increased significantly as a function of density. The conductivity and ionic flow (Na^+ , K^+ , Cl^-) were lower in the treatment with 5% HMS mainly at higher density. The number of mucosal cells neutral and acidic gills was lower in 5% HMS at the higher charge density. The use of HMS at 5% concentration may be recommended for the transport of long-lived tambaqui juveniles 17h. Although it did not differ significantly from the control group in the percentage of survival, however, it presented low fluctuations in pH values at all densities and at the density of 90 fish / L it reduced the efflux of Na^+ and K^+ and Cl^- ions, and did not stimulate the production of neutral and acidic gill mucosal cells, which proved to be a potential stress reducer and effective at higher densities. This work is the first study with the use of *Myrcia sylvatica* hydrolate with application in aquaculture management.

Key-words: survival, transport, density, hydrolate

Sumário	
Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução Geral	09
Objetivos.....	15
Geral.....	15
Específicos	15
Artigo: Hidrolato de <i>Myrcia sylvatica</i> (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE) como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	16
Resumo	16
Introdução	17
Material e Métodos	18
Material Vegetal (Planta)	18
Extração do Hidrolato	19
Procedimento Experimental	19
Amostras e Análise da Água	20
Fluxo Líquido de Íons	20
Análise Histológica e Densidade de Células Mucosas Branquiais	21
Análise Estatística	21
Resultados	21
Caracterização Química do Hidrolato	21
Sobrevivência após o Transporte	22
Parâmetros Físicos e Químicos da Água de Transporte.....	23
Fluxo Líquido de Íons	24
Densidade de Células Mucosas Branquiais.....	25
Discussão	26
Conclusão.....	29
Agradecimento	29
Referências.....	30
Considerações Finais	34
Referências Bibliográficas.....	34
Anexo A- Normas para submissão de artigo para revista <i>Aquaculture International</i>	42
Anexo B- Autorização do Comitê de Ética	49

Introdução Geral

No âmbito global, a aquicultura tem um cenário futuro de crescimento, onde estima-se que a produção pode chegar a atingir 195,9 milhões de toneladas em 2025. Nos países da América Latina essa produção poderá chegar a 3,7 milhões de toneladas, um aumento de 39,9% para o setor em comparação com 2013-2015, já o Brasil deve registrar um crescimento de 104% (FAO, 2016).

O crescimento produtivo em grande escala do pescado em cativeiro está atrelado ao fato das espécies produzidas no país apresentarem elevado potencial produtivo. Contudo, é necessário que a atividade se desenvolva dentre as boas práticas de manejo, com técnicas apropriadas de criação para o desenvolvimento e sucesso da atividade e com o mínimo impacto ambiental (Santos, 2009).

Na piscicultura as práticas de manejo, como a biometria, análises patológicas, implantes hormonais e transporte frequentemente expõem os peixes a uma variedade de fatores estressantes, causando queda no seu desempenho (Vidal *et al.*, 2007; Mercy *et al.*, 2013), podendo causar traumas e até mesmo a morte (Trushenski *et al.*, 2013)

Os efeitos fisiológicos desses agentes estressores sobre os peixes podem ser divididos em três respostas: a primária que é caracterizada pelo aumento dos níveis de cortisol plasmático e catecolaminas, que estimulam a hidrólise de glicogênio no fígado aumentando os níveis de glicose no sangue, além do aumento dos batimentos cardíacos e diminuição da proteína muscular, marcando o início da resposta secundária que é marcada pelas alterações na glicemia, incluindo mobilização rápida das reservas de energia, mudanças na capacidade de trocas iônicas e diminuição do número de linfócitos. A resposta terciária é marcada pela baixa resistência imune dos peixes, causada pela diminuição do número de linfócitos (linfocitopenia) (Bonga, 1997; Maricchiolo e Genovese, 2011).

A magnitude e a duração das respostas ao estresse são de acordo com o tipo de agressor e do tempo e intensidade de exposição, causando efeitos indesejáveis deflagrados no metabolismo, problemas no crescimento, desenvolvimento, capacidade reprodutiva, comportamento e resistência a doenças (Schreck *et al.*, 2016).

Uma das maneiras de se avaliar o estresse em peixes é verificar a estrutura histológica branquial, devido à importância deste órgão no processo respiratório e osmorregulação (Cavichiolo, 2009). As brânquias possuem vários tipos celulares, entre elas podemos destacar as células mucosas. As células mucosas possuem distribuição diferenciada dependendo da fase de desenvolvimento. Entretanto, estas células são encontradas principalmente nas brânquias e epitélio intestinal, exercendo principalmente função de proteção (Dezfuli *et al.*,

2010). Essa proteção ocorre com a estimulação da produção de muco em função do aumento da densidade das células mucosas, para evitar danos ocasionados por situações adversas ou produtos diluídos na água por ação do contato direto (Paulino, 2012; Sveen *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017).

Segundo Perry e Capaldo (2011) o estresse provoca a liberação de catecolaminas, que desencadeia o aumento da ventilação branquial e conseqüentemente a passagem mais rápida da água pelas brânquias. Isso aumenta as trocas iônicas com o ambiente e os peixes de água doce que são hiperosmóticos em relação ao meio, aumentam a perda de íons e ganho de água (Zeppenfeld *et al.*, 2014; Salbego *et al.*, 2015)

Dentre os procedimentos que provocam o estresse em peixes durante a produção em cativeiro, podemos destacar o transporte como um dos maiores causadores (Takahashi *et al.*, 2006). O transporte de juvenis de várias espécies de peixes como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), entre outros, são geralmente realizados em sacos plásticos. Para o procedimento é adicionado água, seguido do peixe, gás oxigênio, e por último, o lacre no saco plástico (Gomes, 2003).

No processo de transporte de peixes, uma etapa que se torna imprescindível é determinar a densidade de carga, ou seja, o número de indivíduos por litro de água. Esse estágio é um dos fatores principais de bem-estar animal, e com grande capacidade de alteração dos parâmetros físicos e químicos da água, podendo causar mortalidade ou comprometer o crescimento do animal após o transporte (Garcia *et al.*, 2015). O manejo inadequado pode levar a alta debilidade e mortalidade prejudicando o sistema produtivo (Ross e Ross, 2008).

Segundo Grottum *et al.* (1997), o principal fator de sucesso do transporte é manter a maior densidade de peixes no menor volume de água possível, sem que haja mortalidade, deterioração da qualidade da água e estresse. A densidade de carga atrelada ao tempo de duração do transporte está diretamente ligada à sobrevivência dos animais transportados, mostrando a necessidade de se conhecer estudos relacionados a transporte de viagens de longa duração (Gomes *et al.*, 2006a). Gomes (2003) elaborou um protocolo para transporte de juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) 3-5 cm destacando a forte relação da densidade de carga e tempo de transporte, visando facilitar o manejo no transporte e contribuir para o bem-estar dos animais transportados. Entretanto, problemas relacionados à qualidade e sobrevivência dos peixes durante e após o transporte ainda é motivo de preocupação dos produtores, distribuidores e compradores de alevinos.

Tem se buscado alternativas a exemplo da adição de sal na água com a finalidade de reduzir a diferença osmótica entre a água doce e o plasma do peixe, que teoricamente diminuiria a perda de íons do peixe para a água doce (Baldisserotto *et al.*, 2017). No entanto para varias espécies o uso do sal não mostrou resultado favoráveis tais como *Rhamdia quelen* (Gomes *et al.*, 1999) juvenis de *Arapaima gigas* (Gomes *et al.*, 2006b; Brandao *et al.*, 2008) e juvenis de tambaqui *C. macropomum* (Gomes *et al.*, 2006a).

Em piscicultura, é possível reduzir os efeitos estressantes provocados pelo transporte através da sedação dos peixes com o uso de substâncias anestésicas (Costas *et al.*, 2011). Anestesia é um estado reversível de depressão do sistema nervoso central, acompanhada de perda sensorial envolvendo hipnose, analgesia, a supressão da atividade reflexa e relaxamento do músculo voluntário. Sedação é um estado preliminar da anestesia em que a sonolência é induzida, com a percepção sensorial entorpecida e com alguma analgesia. Os anestésicos podem ser locais ou gerais e agem via brânquias difundindo-se pelo sangue e agem no sistema nervoso, 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 GABAA. 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).

As substâncias anestésicas mais utilizadas na aquicultura são a triclaína metano sulfonato (MS-222), a benzocaína, o metomidato e o 2-fenoxietanol. No entanto, a utilização destas drogas sintéticas revelou eficiência anestésica variável e tendem a causar efeitos adversos em peixes, tais como perda de muco, irritação das brânquias e danos na córnea (Inoue *et al.*, 2003). Dentre os citados acima o único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) é o MS-222, o qual não é produzido no Brasil, é o anestésico mais amplamente usado em peixes no mundo (Readman *et al.*, 2013; Trushenski *et al.*, 2013). O alto custo deste produto e a dificuldade de importação dificultam o seu uso principalmente por pequenos piscicultores (Roubach *et al.*, 2005).

No Brasil, a benzocaína é o anestésico mais utilizado em manejo de peixes. É muito similar ao MS-222, porém a concentração de MS-222 necessária para anestésiar um peixe é cerca de dez vezes mais cara que uma concentração similar de benzocaína (Gomes *et al.*, 2001; Roubach e Gomes, 2001). Entretanto, nem todos os anestésicos usados em aquicultura têm efeito (inibição) sobre a cascata de stress apresentada pelos peixes (Zahl *et al.*, 2010).

Alguns desses anestésicos citados, como o MS-222, benzocaína e metomidato tem demonstrado ser indutor de estresse em algumas espécies de peixes, aumentando o nível de cortisol no sangue (Zahl *et al.*, 2012). Carneiro *et al.* (2002), transportando matrinxãs, *Brycon cephalus*, verificaram que o uso da benzocaína mostrou efeitos negativos em duas concentrações (10 e 20 mg L⁻¹) nos parâmetros hematológicos, concluindo que essa substância não reduziu o estresse causado pelo transporte.

O uso de extrativos vegetais (como os óleos essenciais- OE) e seus subprodutos tem se intensificado na aquicultura como estimuladores de apetites, anti-estresse, imunoestimuladores, anti-patogênicos e sedativos/anestésicos (Reverter *et al.*, 2014). Os óleos essenciais como uma das opções desses extrativos são substâncias voláteis, de origem terpênic, que podem possuir atividades biológicas (Gonçalves *et al.*, 2008; Saccol *et al.*, 2013; Soltani *et al.*, 2014). Em outras palavras, apresentam um grande potencial medicinal e podem ser usados no desenvolvimento de novas drogas alternativas, pois apresentam um amplo espectro de efeitos farmacológicos indicados, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas (Scherer *et al.*, 2009; Milezzi *et al.*, 2013) além de efeitos sedativos e anestésicos (Parodi *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015a; Hohlenwerger *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017).

Façonha e Gomes (2005) relatam que é viável o uso de óleos essenciais de plantas como anestésicos naturais para peixes, principalmente por se tratar de uma substância de baixo custo, e facilidade de obtenção comparada com produtos químicos utilizados para o mesmo fim. Dessa forma as pesquisas em produtos naturais são necessárias para substituir produtos sintéticos (Boijink *et al.*, 2016).

Alguns estudos mostraram a utilização de alguns óleos essenciais extraídos a partir de plantas como alternativa anestésica em peixes, tais como o eugenol (Sanchez *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2015) e mentol (Simões e Gomes, 2009; Hoshiba *et al.*, 2015), e também alguns óleos essenciais, como os obtidos a partir de *Aloysia triphylla* (Parodi *et al.*, 2014), *Lippia alba* (Cunha *et al.*, 2011; Toni *et al.*, 2015a; Hohlenwerger *et al.*, 2016) e *Ocotea cutifolia* (Silva *et al.*, 2013a) *Cymbopogon nardus* (Barbas *et al.*, 2017), *Curcuma longa* e *Myrcia sylvatica* (Saccol *et al.*, 2017b) demonstraram atividade anestésica em diferentes espécies de peixes.

A *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (Myrtaceae), é uma planta com ampla distribuição na América do Sul, e frequentemente usada na medicina popular na Região Amazônica (Zoghbi *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial de *M. sylvatica* tem efeitos anestésicos e sedativos em matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Saccol *et al.*, 2017a) e

tambaqui (*C. macropomum*) (Saccol *et al.*, 2017b), associado a redução do estresse devido à diminuição dos níveis de cortisol.

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 fitopatogênico (Lustosa *et al.*, 2011), microbiano/antibacteriano (Silva *et al.*, 2016) e 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.

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 hidrossolúveis, a exemplo de ácidos, aldeídos, amins e princípios ativos presentes no OE (Franzener *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2017).

Apenas um pequeno número de estudos foram realizados com hidrolatos na criação de animais: atividade antihelmíntica do hidrolato de *Menthavillosa* em bovinos (Nascimento *et al.*, 2009) e propriedades fungicidas e bactericidas de *Helietta apiculata*, *Conyza canadensis* e hidrolato de *Cymbopogon nardus* (Franzener *et al.*, 2007). No entanto, foi encontrado somente um trabalho com aplicação de hidrolato na aquicultura. Silva *et al.* 2017 avaliou o uso de hidrolato de *Lippia alba* em transporte simulado de tambaqui em diferentes densidades de carga e concluiu que o produto tem um potencial redutor de estresse, baixo custo e hidrossolúvel em água.

Desse modo, o uso de fitoterápicos vem ganhando espaço na produção animal por reduzirem os efeitos estressantes, em geral atóxicos ao ambiente e na sua maioria não provocarem reações adversas aos peixes (Soares e Tavares-Dias, 2013).

Tendo em vista a necessidade de manejos em piscicultura (como biometrias, reprodução e transporte) e em trabalhos experimentais aplicados a biologia de peixes (como cirurgias e implantes diversos) torna-se importante estudar a eficiência dos diferentes tipos de produtos anestésicos para que haja menos estresse dos peixes, promover o bem-estar animal e evitar mortalidades nas práticas rotineiras aplicadas aos animais (Bittencourt *et al.*, 2012).

Em face a necessidade de formulação de produtos de baixo custo e de fácil acesso aos pequenos piscicultores em virtude do grande potencial piscícola no país. Os sedativos de origem natural podem ser opções para reduzir esses problemas. Com isso investigar o uso de substâncias de origem de plantas da região Amazônica, principalmente os seus subprodutos da

extração dos óleos essenciais que geralmente são descartados, é de fundamental importância. O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de manejo e incentivo à utilização de produtos que minimizem o efeito residual ao meio ambiente, além de agregar valor à biodiversidade, beneficiam a escala produtiva dos fitoterápicos aplicados à aquicultura.

Diante disto, este trabalho visa contribuir para o aproveitamento de um subproduto das extrações dos materiais vegetais e buscar alternativas para reduzir o estresse no transporte de tambaqui sob diferentes densidades de carga, proporcionando maior índice de sobrevivência após o transporte.

Portanto, diante do potencial promissor do uso dos subprodutos dos extrativos vegetais este estudo tem como objetivo avaliar o uso de Hidrolato de *M. sylvatica* (G. Mey.) DC. como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui em diferentes densidades de carga. Além disso, avaliar os efeitos do hidrolato sobre a melhoria da qualidade de água e alterações na morfofisiologia branquial (densidade de células mucosas).

Esta dissertação foi organizada em forma de uma introdução geral, objetivos gerais e um artigo científico, a ser submetido para a revista *Aquaculture International* (normas em anexo-A). As figuras e tabelas foram inseridas no corpo do texto para melhor compreensão das informações e visualização dos resultados. Entretanto, na formatação final (as figuras e tabelas) serão distribuídas segundo as normas da revista. Posteriormente ao artigo científico foi descrito o tópico considerações finais.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o uso do hidrolato de *M. sylvatica* como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) em diferentes densidades de carga.

Específicos

Avaliar a sobrevivência dos juvenis de tambaqui após o transporte nas densidades (30, 60 e 90 peixes/L) e diferentes concentrações de hidrolato de *M. sylvatica* (2.5, 5 e 7.5 %).

Determinar a concentração de sedação de hidrolato de *M. sylvatica* em função da densidade de carga para uso no transporte de juvenis de tambaqui.

Verificar os efeitos do uso de hidrolato de *M. sylvatica* nos parâmetros físicos e químicos da água após o transporte de juvenis de tambaqui em diferentes densidades.

Determinar o fluxo iônico (Na^+ , K^+ , Cl^-) e excreção de amônia total e não ionizada durante o transporte dos juvenis de tambaqui nas diferentes densidades e concentrações de hidrolato de *M. sylvatica*.

Caracterizar a densidade de células mucosas branquiais de juvenis de tambaqui após o transporte em diferentes densidades e concentrações de hidrolato de *M. sylvatica*.

Artigo

Hidrolato de *Myrcia sylvatica* (G.MEY.) DC. (MYRTACEAE) como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Jonas da Silva Costa^{1, 2*}, Hugo Napoleão Pereira da Silva¹, Elen Monique de Oliveira Sousa¹, Raiane Caroline Sousa Silva^{1,3}, Andria Simone Oliveira Valente^{1,2}, Sand Dara dos Santos Machado^{1,3}, 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 Amazônicos- PPGRACAM;

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

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS) como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de *Colossoma macropomum*. Foi realizado transporte simulado de 17h, nas densidades de carga (30, 60 e 90 peixes/L) com 2,5; 5; e 7,5 % de hidrolato de *Myrcia sylvatica* (HMS) e tratamento controle água (C.A). Foi avaliada a sobrevivência (após a simulação de transporte e após 24h.). Os parâmetros físicos e químicos da água e o fluxo de Na⁺, K⁺ e Cl⁻, foram avaliados antes e após o transporte. A densidade de células de mucosas foi observada após o transporte. Não houve diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos e as diferentes densidades. A temperatura, dureza, amônia total e não ionizada não mostraram diferença significativa entre os tratamentos e densidade. Já o pH apresentou diferença mesmo no valores iniciais, reduzindo em função do aumento da concentração de HMS. O oxigênio dissolvido foi significativamente menor quando se comparou os valores iniciais e finais. A alcalinidade e sólidos totais dissolvidos aumentaram significativamente em função da densidade. A condutividade e fluxo iônico (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) foram menores no tratamento com 5% de HMS principalmente na maior densidade. O número de células mucosas brânquias neutras e ácidas foi menor em 5% de HMS na maior densidade de carga. Portanto, sugere-se que o HMS 5% pode ser considerado uma alternativa como sedativo para o transporte de juvenis de tambaqui, principalmente na maior densidade (90 peixes/L) em até 17h de transporte, pois diminuiu a perda destes íons em comparação com controle. Este trabalho é o primeiro estudo com uso de HMS com aplicação em manejo na aquicultura.

Introdução

Os procedimentos comuns em práticas de aquicultura e pesquisas aplicadas (por exemplo, captura, manuseio, transporte, análise biométrica, densidade de estoque) são estressantes para peixes e ativam alterações fisiológicas, muitas vezes, resultando em mortes e perdas substanciais para o setor aquícola (Mommsen et al. 1999; Tort 2011; Mazandarani et al. 2017).

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), é um peixe de água doce nativo das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco, e possui um alto valor de mercado em todo o mundo (Gomes et al. 2010). Os juvenis dessa espécie, geralmente são transportados em sacos plásticos com água e oxigênio puro, porém a alta mortalidade de juvenis durante o transporte ainda é um grande problema para os produtores de peixe (Gomes 2003).

O tempo de transporte afeta a sobrevivência dos peixes, bem como a deterioração da qualidade da água alterando os parâmetros químicos (principalmente oxigênio dissolvido e amônia), cuja extensão aumenta com a densidade da carga (Becker et al. 2013; Golombieski et al. 2003). Maior perda de íons e excreção de amônia durante o transporte podem ser induzidas pelo estresse (Becker et al. 2012) e como mecanismo de proteção contra mudanças de qualidade da água, o peixe estimula a proliferação de células mucosas e secreção mucosa (Guardiola et al. 2016; Sveen et al. 2016).

Para facilitar o manuseio, minimizar o risco de infligir dor ou lesões e evitar o estresse nos peixes o uso de sedativos são indicados na água do transporte para tentar diminuir os níveis de estresse do peixe e melhorar consequentemente a qualidade da água como a benzocaína (Inoue et al. 2010), eugenol e extrato metanólico de *Condalia buxifolia* (Becker et al. 2013; Salbego et al. 2015).

A *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (Myrtaceae), é uma planta com ampla distribuição na América do Sul, e é frequentemente usada na medicina popular na Região Amazônica (Zoghbi et al. 2003). Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial de *Myrcia sylvatica* tem efeitos anestésicos e sedativos em juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Saccol et al. 2017a) e tambaqui (*C. macropomum*) (Saccol et al. 2017b), associado a redução do estresse devido à diminuição dos níveis de cortisol.

Segundo Cascaes et al. (2015) os óleos essenciais (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 fitopatogênico (Lustosa et al. 2011), microbiano/antibacteriano (Silva et al. 2016),

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.

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).

Poucos estudos foram realizados com o uso de hidrolatos na produção animal: atividade antihelmíntica do hidrolato de *Mentha villosa* em bovinos (Nascimento et al. 2009) e propriedades fungicidas e bactericidas de *Helietta apiculata*, *Conyza canadensis* e hidrolato de *Cymbopogon nardus* (Franzener et al. 2007). No entanto, há somente um trabalho com aplicação de hidrolato na aquicultura. Silva et al. 2017 avaliou o uso de hidrolato de *Lippia alba* em transporte simulado de tambaqui e concluiu que o produto tem um potencial redutor de estresse, baixo custo e hidrossolúvel em água. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de Hidrolato de *M. sylvatica* (G. Mey.) DC. como sedativo em condições simuladas de transporte de juvenis de tambaqui em diferentes densidades de carga. Além disso, avaliar os efeitos do hidrolato sobre a qualidade de água e alterações na morfofisiologia branquial (densidade de células mucosas).

Material e Métodos

Material Vegetal (Planta)

A parte aérea da *M. sylvatica* (G.Mey.) DC. foi coletada em setembro de 2016, correspondendo ao período seco do ano. A planta foi coletada no município de Santarém – PA (latitude 02°30’32,1” S e longitude 54°54’59,8” O) em uma área caracterizada como região de savana, às margens da Rodovia PA-457 (Comunidade Santa Rosa) a qual liga a cidade de Santarém à vila de Alter-do-Chão-PA. A identificação da espécie ocorreu por método de comparação, com base nas amostras depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, em Manaus (INPA/AM). A espécie utilizada nesse estudo foi identificada como similar às exsicatas de nº 163551 e 163770 do herbário do INPA/AM, procedente de Alter-do-Chão, Santarém - PA.

Extração do Hidrolato

A extração do hidrolato de *M. sylvatica* foi realizada no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará- LABBEX-UFOPA. A parte aérea da planta (folhas) foi separada e pesada em balança semi-analítica. Em seguida foi colocada em sacos de papel e em estufa, a temperatura de 40°C, por um período de 72 h. Posteriormente, as folhas desidratadas foram reduzidas a fragmentos menores por meio de trituração e inseridas no balão volumétrico, onde foi adicionada água destilada até a imersão completa das folhas.

O hidrolato foi obtido por meio da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparato de Clevenger (Marca Vidrolabor), com o tempo de três horas de processamento, tempo máximo para cessar a extração de óleo essencial. O hidrolato obtido na extração foi armazenado em galão de plástico devidamente impermeabilizado e sob refrigeração (- 20°C).

Após a extração retirou-se uma alíquota a qual 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 19 espectros de massa com bibliotecas referências (Adams 2006; Mondello 2011; Nist 2011) no programa GCMS Prostrun Analysis.

Procedimento Experimental- Transporte Simulado

Os experimentos foram realizados na Unidade Agropecuária UAGRO-Santa Rosa/-SEDAP- Santarém-PA, local onde os juvenis também foram adquiridos. Os experimentos de transporte foram simulados com duração de 17h. Foram utilizados 2.160 juvenis de tambaqui com comprimento total (entre 3 a 5 cm) ($1,1 \pm 0,38$ g) os quais foram submetidos a um jejum prévio de 24h antes da simulação de transporte. Os juvenis foram colocados em sacos plásticos (3L), contendo 1L de água do reservatório oriunda de um igarapé que abastece a unidade e volume completado com oxigênio puro, em diferentes densidades de carga: 30 (46.75 ± 8.1 g/L), 60 (93.5 ± 16.3 g/L) e 90 (140.25 ± 24.5 g/L) juvenis por litro em quatro concentrações de hidrolato de *M. sylvatica* (2.5, 5 e 7.5 %) adicionado diretamente na água antes de colocar os peixes e um tratamento controle água (C.A). Durante a simulação, os sacos de transporte foram colocados em uma sala com temperatura ambiente (aproximadamente 28°C), com circulação periódica de pessoas e com som de bombas de aeração, sendo que a cada 2h os sacos foram movimentados manual e individualmente. Após a simulação de transporte os juvenis foram transferidos para recipientes plásticos (7L),

contendo água limpa para recuperação dos animais pós transporte com aeração constante para verificação da sobrevivência, quanto ao comportamento fisiológico (presença de reflexos, natação e equilíbrio na coluna de água, surgimento de protusão labial, e mortalidade) onde permaneceram nessas condições por 24 h, estimados a partir da contagem dos animais para avaliação da mortalidade logo após o transporte, conforme protocolo adaptado de (Becker et al. 2012).

Amostras e Análise da Água

Os parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados antes e depois do transporte simulado. A temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L), condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}$), pH e sólidos totais dissolvidos (ppm) foram medidos utilizando equipamentos portáteis. Amostras de água foram coletadas antes e após o transporte para verificação da amônia total que foi determinada pelo método do salicilato-hipoclorito de acordo com (Verdouw et al.1978), a amônia não-ionizada foi calculada segundo (Colt e Tomasso 2002), dureza total pelo método tritimétrico com EDTA e a alcalinidade de acordo com (Boyd e Turker 1992).

Fluxo Líquido de Íons

A água foi coletada antes e depois do transporte para avaliação do fluxo iônico de Na^+ , K^+ e Cl^- . Os valores de Cl^- na água foram determinados segundo (Zallet al.1956), e os de Na^+ e K^+ com o auxílio de fotômetro de chama (Marca Benfer, modelo LB-BFC300). As soluções padrões foram feitas com reagentes de grau analítico devidamente dissolvido em água deionizada e cada íon verificado teve a sua curva padrão definida através de cinco diferentes concentrações. O fluxo líquido de íons foi calculado de acordo com a fórmula descrita abaixo.

$$F_i = \frac{V ([\text{Ion}_1] - [\text{Ion}_2])}{M \cdot t}$$

Onde $[\text{Ion}_1]$ e $[\text{Ion}_2]$ é a concentração dos íons da água de transporte no início e do fim do período do transporte, respectivamente, V é o volume de água em litros, M é a massa do peixe em quilos e t é a duração do transporte em horas (Val et al.1998).

Análise Histológica e Densidade de Células Mucosas Branquiais

Após o transporte coletou-se cinco juvenis/repetição/tratamento dentre os sobreviventes para o processamento histológico, os mesmos foram eutanasiados através de secção medular e fixados inteiros em solução de Bouin (24h, temperatura ambiente), posteriormente lavados em álcool 50% e armazenados em álcool 70%. Foram extraídos os arcos branquiais e em seguida, foi feito a inclusão em parafina da parte mediana do terceiro arco branquial. Foram utilizadas secções de cinco cortes/animal, em perfil sagital com espessura de 5µm em micrótomo (marca Leipzig). Os cortes foram corados utilizando solução de Alcian Blue pH-2,5 para marcação de células mucosas ácidas e Ácido Periódico e Reativo de Shiff (Solução PAS) para marcação de células mucosas neutras. As células mucosas branquiais foram identificadas e quantificadas com o auxílio de microscópio (ZEISS Axio modelo-AGmbH37081) acoplado com sistema de captação de imagem (ZEISS, modelo-AxioCamErc 51) e programa de medidas interativas (Image-PRO PLUS) obtendo-se assim a densidade de células mucosas brânquias em mm².

Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O teste de Shapiro-Wilk foi feito para avaliar normalidade. Em seguida foi realizada a análise de variância com dois fatores (ANOVA TWO WAY) (densidade x tratamentos) utilizada para avaliar o nível de significância. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey para a comparação de médias ($p < 0,05$) através do software Sigma Plot v.11.

Resultados

Caracterização Química do Hidrolato

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 podem ser observados 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 *M. 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
32.92	Guaiol	2.06		1604	1600
33.95	1 EpiCubenol	2.99	3.32	1630	1627
34.61	Alfa Muurolol	2.24		1645	1644
35.80	Cadalenol	4.29	4.67	1677	1675
35.83	Mustakone	2.39	2.57	1680	1676

Sobrevivência após Transporte

Após o experimento de transporte simulado verificou-se que não houve diferença significativa na sobrevivência logo após o transporte ($p > 0,05$) entre os tratamentos e densidades de carga (Figura 1a), o mesmo foi observado na sobrevivência após 24h de transporte (Figura 1b).

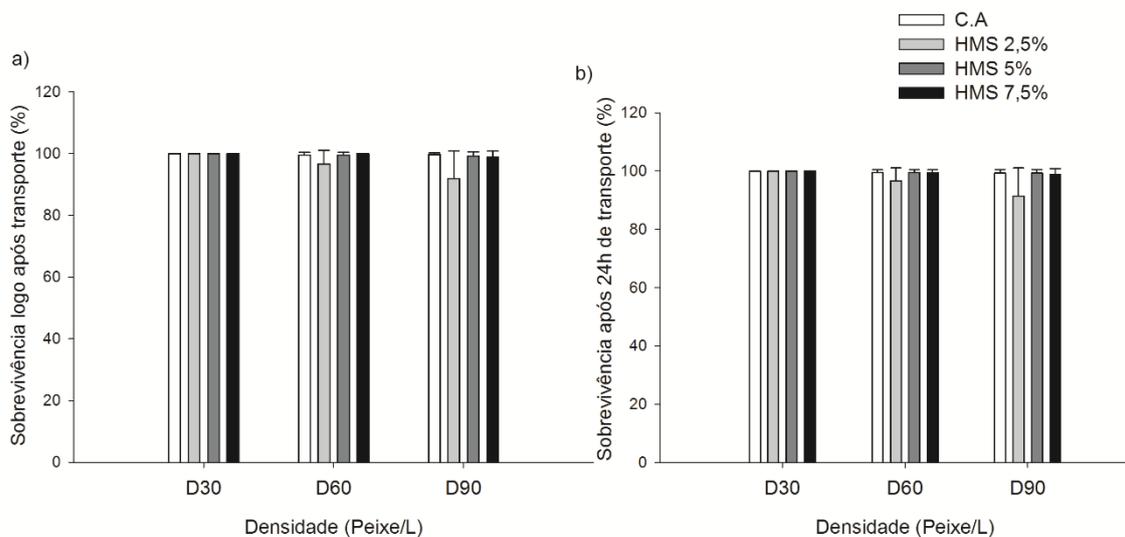


Figura 1. Sobrevivência logo após o transporte (a) e sobrevivência após 24h de transporte (b) em diferentes densidades (D) 30, 60 e 90 peixes por litro, com apenas água (C.A) e concentrações de Hidrolato de *M. sylvatica* (HMS) em 2.5, 5, e 7,5%.

Parâmetros Físicos e Químicos da Água de Transporte

A temperatura e dureza da água antes e depois do experimento não mostraram diferença significativa em relação à densidade e aos tratamentos, apresentando valores médios de $26,01 \pm 0,13$ °C e $1,72 \pm 0,27$ (mg/L).

O oxigênio dissolvido foi significativamente diferente quando se comparou os valores iniciais e finais. No entanto não houve diferença entre os tratamentos com o HMS e em função da densidade de carga (Tabela 2). Já o pH apresentou diferença significativa mesmo entre os valores iniciais, reduzindo os valores do pH em função do aumento da concentração do HMS, bem como ao final da simulação apresentou diferença significativa entre os tratamentos nas densidades de (30 e 60 peixes/L) reduzindo o pH quando comparado ao controle. No entanto, os tratamentos na densidade de 90 peixes/L não apresentaram diferença significativa, houve estabilização dos valores de pH em todas os tratamentos com HMS em função da densidade, diferindo do controle (Tabela 2).

A condutividade elétrica da água não mostrou diferença significativa entre os tratamentos na densidade de 30 peixes/L. No entanto, aumentou nas maiores densidades (60 e 90 peixes/L). A condutividade reduziu no tratamento com 5% de HMS na densidade de 90 peixes/L, sendo menor em quando comparado com o tratamento controle (Tabela 2).

A Alcalinidade da água não mostrou diferença significativa entre os tratamentos na densidade de 30 peixes/L. Entretanto reduziu em todos os tratamentos comparado ao controle na densidade de 60 peixes/L, e aumentou no tratamento com 2,5% de HMS na densidade de 90 peixes/L, quando comparado com controle (Tabela 2). Os Sólidos totais dissolvidos (TDS) reduziu no tratamento com 5% de HMS na densidade de 60 peixes/L, e na densidade de 90 peixes/L, sendo menor quando comparado com controle (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de Oxigênio dissolvido (mg/L), pH, Condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}$) Alcalinidade (mg/L) e Sólidos totais dissolvidos (ppm) inicial e após o transporte simulado de 17h com juvenis de tambaqui em diferentes densidades 30, 60 e 90 peixes por litro, com apenas água (C.A), e Hidrolato de *M. sylvatica* (HMS) em 2,5, 5, e 7,5%.

Oxigênio dissolvido (mg/L)				
	Inicial	D30	D60	D90
C.A	5,4 \pm 0,00 ^{Aa}	2,05 \pm 0,23 ^{Ba}	0,90 \pm 0,26 ^{Ca}	0,70 \pm 0,26 ^{Ca}
HMS-2,5%	4,7 \pm 0,00 ^{Aa}	1,13 \pm 0,25 ^{Bb}	1,00 \pm 0,20 ^{Ba}	0,70 \pm 0,20 ^{Ba}
HMS-5%	4,0 \pm 0,00 ^{Aa}	1,03 \pm 0,32 ^{Bb}	0,55 \pm 0,05 ^{Ba}	0,60 \pm 0,00 ^{Ba}
HMS-7,5%	3,9 \pm 0,00 ^{Aa}	0,80 \pm 0,10 ^{Bb}	0,76 \pm 0,15 ^{Ba}	0,50 \pm 0,10 ^{Ba}
pH				
C.A	7,36 \pm 0,00 ^{Aa}	6,44 \pm 0,03 ^{Ba}	6,35 \pm 0,03 ^{Ca}	6,17 \pm 0,03 ^{Da}
HMS-2,5%	7,02 \pm 0,00 ^{Ab}	6,27 \pm 0,00 ^{Bb}	6,22 \pm 0,04 ^{Bb}	6,20 \pm 0,05 ^{Ba}
HMS-5%	6,97 \pm 0,00 ^{Abc}	6,23 \pm 0,04 ^{Bb}	6,27 \pm 0,02 ^{Bab}	6,22 \pm 0,03 ^{Ba}
HMS-7,5%	6,92 \pm 0,00 ^{Ac}	6,29 \pm 0,06 ^{Bb}	6,22 \pm 0,06 ^{Bb}	6,21 \pm 0,06 ^{Ba}
Condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}$)				
C.A	47,60 \pm 0,00 ^{Aa}	121,33 \pm 8,56 ^{Ba}	200,00 \pm 31,57 ^{Cab}	328,66 \pm 31,62 ^{Dac}
HMS-2,5%	47,00 \pm 0,00 ^{Aa}	122,53 \pm 10,10 ^{Ba}	226,50 \pm 1,50 ^{Ca}	354,50 \pm 27,50 ^{Da}
HMS-5%	44,60 \pm 0,00 ^{Aa}	110,63 \pm 1,62 ^{Ba}	189,26 \pm 5,39 ^{Cb}	294,00 \pm 7,55 ^{Db}
HMS-7,5%	43,70 \pm 0,00 ^{Aa}	115,43 \pm 2,31 ^{Ba}	198,43 \pm 4,55 ^{Cab}	309,66 \pm 9,01 ^{Dabc}

Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)				
C.A	22,00±2,20 ^{Aa}	47,30± 1,10 ^{Ba}	78,10±1,10 ^{Ca}	87,26±4,58 ^{Da}
HMS-2,5%	19,06±1,27 ^{Aa}	47,30± 1,10 ^{Ba}	69,30±1,10 ^{Cab}	102,66±16,21 ^{Db}
HMS-5%	19,80±2,20 ^{Aa}	42,90±1,10 ^{Ba}	66,00±2,20 ^{Cb}	90,20±6,60 ^{Da}
HMS-7,5%	19,80±0,00 ^{Aa}	40,33±3,36 ^{Ba}	63,80±2,20 ^{Cb}	92,40±7,93 ^{Dab}
Sólidos totais dissolvidos (ppm)				
C.A	32,60±0,00 ^{Aa}	84,23±6,12 ^{Ba}	160,66±2,81 ^{Ca}	229,66±16,77 ^{Dac}
HMS-2,5%	31,50±0,00 ^{Aa}	81,56± 7,73 ^{Ba}	148,66±11,37 ^{Cab}	238,33±19,85 ^{Da}
HMS-5%	30,60±0,00 ^{Aa}	76,63±1,26 ^{Ba}	131,33±3,97 ^{Cb}	202,33±4,16 ^{Db}
HMS-7,5%	30,00±0,00 ^{Aa}	80,06±2,08 ^{Ba}	138,06±2,60 ^{Cb}	214,00±9,00 ^{Dbc}

Letra maiúscula indica diferença significativa entre densidades do mesmo tratamento (linha). Letra minúscula indica diferença significativa entre tratamento da mesma densidade (coluna); ANOVA TWO WAY, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fluxo Líquido de Íons

Houve efluxo dos íons Na⁺ e K⁺ e Cl⁻ durante o transporte em todos os tratamentos (Figura 2). O tratamento 5 % de HMS reduziu o efluxo Na⁺ e K⁺ e Cl⁻ na densidade de 90 peixes/L, reduziu o efluxo Na⁺ e Cl⁻ na densidade de 60 peixes/L, ou seja, diminuiu a perda destes íons em comparação com controle. O tratamento 7,5 % de HMS reduziu o efluxo Na⁺ na densidade de 30 peixes/L em comparação ao grupo controle (Figura 2a). A Amônia total (NH₄ + NH₃) e NH₃ (não ionizada) não mostraram diferença significativa com a densidade e entre os tratamentos, verificou-se os valores respectivos de 3,10±0,13 e 0,0033±0,00035(mg. L⁻¹).

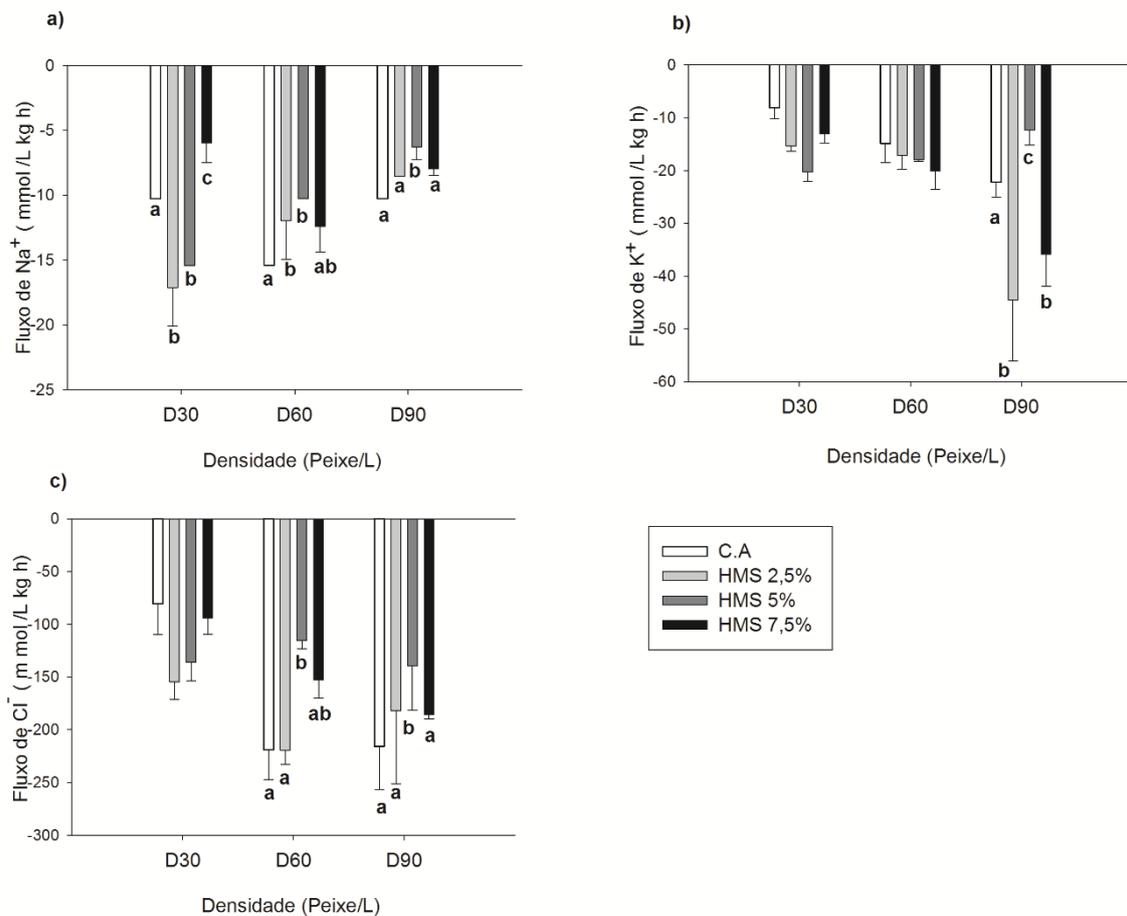


Figura 2. Fluxo iônico de sódio (Na⁺) (a), potássio (K⁺) (b) e cloreto (Cl⁻) (c), após o transporte simulado de 17h em diferentes densidades (30, 60 e 90 peixes/L), com apenas água (C.A) e concentrações de Hidrolato de *M. sylvatica* (HMS) em 2,5, 5, e 7,5%. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. ANOVA TWO WAY, p<0.05 teste de Tukey.

Densidade de Células Mucosas Branquiais

Houve maior produção de células mucosas neutras independentes da densidade de carga. Os tratamentos de HMS 2,5% e 5% não estimularam a produção de células mucosas neutras na densidade de 30 e 90 peixes/L comparado ao controle água. Entretanto não foi observada diferença significativa nas densidades de células mucosas neutras e ácidas na densidade de carga 60 peixes/L, bem como com os tratamentos avaliados nesta densidade (Figura 3a).

Observou-se que o uso do produto independente da concentração não estimulou a produção de células mucosas ácidas na densidade de 30 peixes/L comparado com o tratamento controle. Entretanto, o número de células mucosas ácidas foi menor na maior

densidade de carga (90 peixes/L) com o uso de HMS 5% e 7,5% em relação aos outros tratamentos avaliados (Figura 3b).

A densidade de células mucosas totais é a soma de células mucosas neutras + ácidas, mostrou que a produção dessas células foi graficamente modelado pela densidade de células mucosas neutras, haja vista que foi encontrada em maior número. O número de células mucosas brânquias totais foi menor em 5% de HMS na maior densidade de carga comparado com o controle. (Figura 3c).

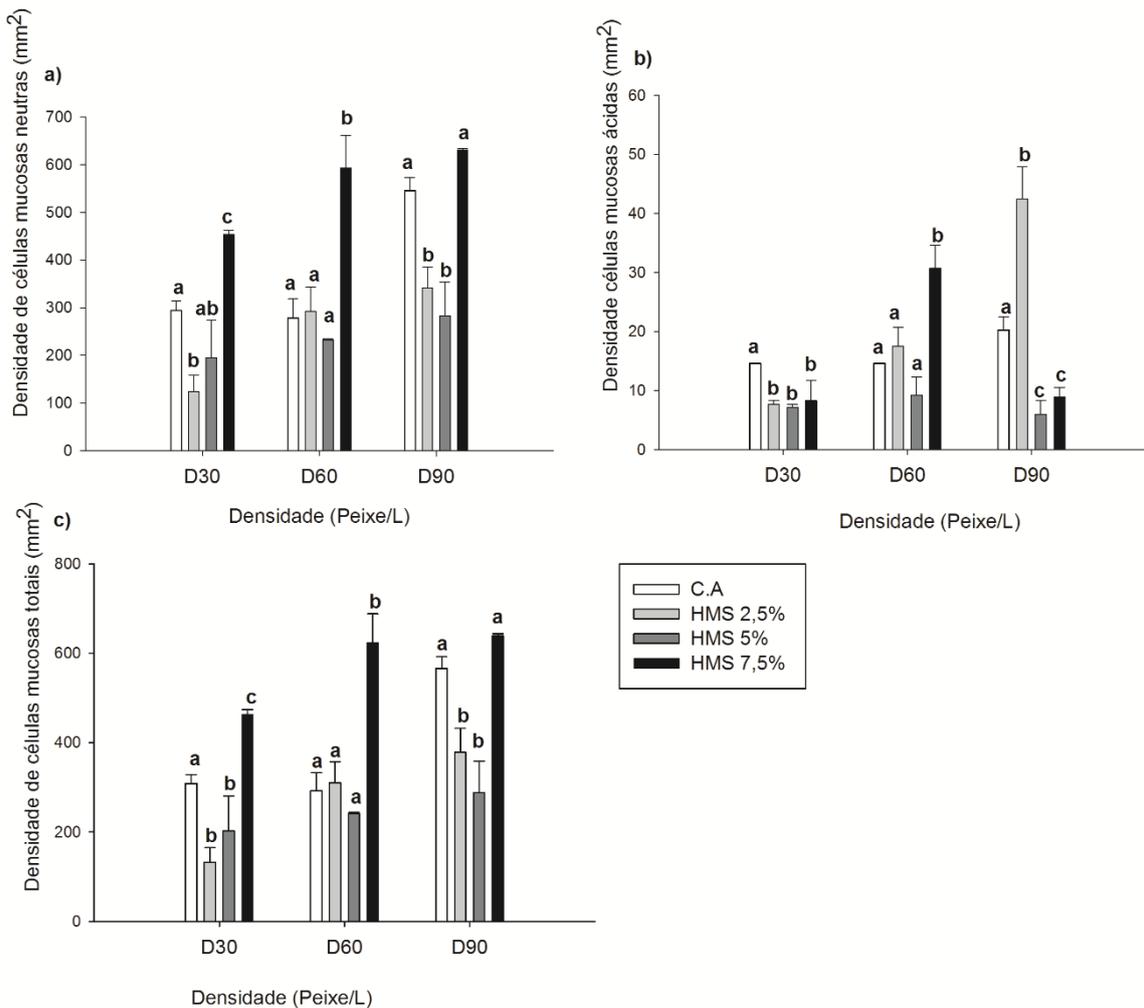


Figura 3. Densidade de células mucosas neutras (a), ácidas (b) e totais (c) (mm²) em brânquias de juvenis de tambaqui após o transporte simulado de 17h em diferentes densidades (D) 30, 60 e 90 peixes por litro, com apenas água (C.A) e concentrações de Hidrolato de *M. sylvatica* (HMS) em 2.5, 5, e 7,5%. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. ANOVA TWO WAY, $p < 0.05$ teste de Tukey.

Discussão

O tempo de transporte de 17 h e a densidade de carga não foram limitantes para a sobrevivencia dos juvenis. Segundo Gomes et al. (2006a) a densidade de carga atrelada ao

tempo de duração do transporte está diretamente ligada à sobrevivência dos animais transportados, os autores testaram gesso, sal e benzocaína (20mg/L) em transporte juvenis de tambaqui (4,09±0,05 cm) por 18 horas, verificaram que a sobrevivência reduziu significativamente com o aumento da densidade em todos os tratamentos, e indicam a possibilidade de até 5% de mortalidade utilizando-se somente água nas densidades de 30 e 45 peixes/L. No entanto, o uso de eugenol e extrato metanólico de *C. buxifolia* reduziu a mortalidade de juvenis de *Rhamdia quelen* transportados por 12 horas em comparação com o grupo controle (Becker et al. 2013)

Com isso observa-se que em alguns estudos o produto, tempo de transporte e densidade de carga pode limitar ou não a sobrevivência dos peixes, em se tratando do presente trabalho o uso do produto mostrou grande importância, haja vista que apresentou maior eficácia na maior densidade. Corroborando com Silva et al. (2017) que estudaram o uso de hidrolato de *Lippia alba* como sedativo em transporte de tambaqui (3-5cm) que também mostrou resultados importantes como a redução do estresse osmorregulatório principalmente na densidade 90 (peixes/L).

Apesar da alta sobrevivência em todos os tratamentos observou-se baixos valores de oxigênio dissolvido na água, evidenciados pelo aparecimento de protusão labial nos juvenis principalmente nas maiores densidades de carga independente do tratamento, um dos fatores que podem explicar a alta sobrevivência nos tratamentos foi a baixa concentração de amônia não ionizada 0,0033±0,00035 (mg/L) sendo que sua toxicidade aumenta em função do aumento de pH e temperatura. Segundo Sampaio e Freire (2016) afirmaram que no transporte de longa duração, o aumento nos níveis de amônia é o principal motivo de deterioração da água. Em relação ao pH, apesar da diferença significativa ($p < 0,05$) em alguns tratamentos, houve uma estabilização dos valores principalmente com a adição do produto, e apresentaram valores dentro da faixa adequada para criação de peixes em geral que variam entre 6,0 a 9,0 e a temperatura 26 a 29° C (Arana 2010; Faria et al. 2013; Leira et al. 2017; Sá 2012). Apresentando valores entre 7,36 a 6,17, dados semelhantes foram encontrados no trabalho de (Tesoureiro 2012) onde o pH da água foi reduzido de 7,5 para 6,0 após 8 h de transporte de bacalhau em diferentes densidades de carga.

Conforme Sipaúba-Tavares (1994), os níveis de dureza total quantificados no presente estudo se mantiveram dentro dos limites favoráveis ao cultivo de peixes de água doce (0-75 mg/L), sendo classificadas como águas moles. Em relação à alcalinidade, afirma que os limites aceitáveis, para um bom desempenho do peixe estão entre 20 a 300 mg/L CaCO₃, pois

esses valores reduzem as variações do pH. Nesse caso, os valores do presente estudo estão dentro desses limites.

Algumas alterações características quanto a qualidade da água pode ser notada devido ao abastecimento da estação de produção de peixes, onde ocorreu o presente estudo. A água da referida estação tem origem de uma barragem de Igarapé (um pequeno rio), isso explica as baixas concentrações de dureza da água $1,72 \pm 0,27$ (mg/L), por ser característico de águas de Igarapés da região Amazônica, ou seja extremamente moles e que geralmente contém poucos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} dissolvidos (Sá 2012). Já os valores iniciais de alcalinidade foram bem maiores, devido ao tratamento da água captada da barragem com a adição de carbonato de sódio para fins de correção de pH. Quando a alcalinidade total da água excede sua dureza total, uma fração do bicarbonato ou carbonato está ligado com potássio ou sódio e não somente a cálcio e magnésio (Arana 2010; Sá 2012). Neste estudo, foi possível verificar de maneira geral que o hidrolato possui pouca influência sobre os parâmetros físico-químicos analisados com variações pouco expressivas nos tratamentos avaliados.

Resultados similares ao presente estudo em que o efluxo de íons foi reduzido e consequentemente foi observado menores valores de condutividade elétrica na maior densidade de carga, foram encontrados em estudos com transporte de juvenis de *Rhamdia quelen* com a utilização de óleo essencial de *Aloysia triphylla* (Parodi et al. 2014) e com animais adultos da mesma espécie mostrou que o efluxo de íons foi menor que no grupo controle (Zeppenfeld et al. 2014).

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). Os resultados do presente estudo corroboram com Silva et al. (2017) que obtiveram diminuição no efluxo de íons de juvenis de tambaqui na concentração de 5% hidrolato de *Lippia alba* na densidade de 90 peixes/L. A redução do fluxo de íons com o uso de sedativos na água também foi reportada em transporte de juvenis de *Rhamdia quelen* com a utilização de eugenol, extrato metanólico *C. buxifolia* (Becker et al. 2013 ; Salbego et al. 2015) e óleo essencial de *Lippia alba* (quimiotipo linalol) (Becker et al. 2012; Salbego et al. 2014; Becker et al. 2015).

O aumento do número e densidade de células mucosas desencadeia o aumento da produção de muco, onde ocorre a proteção epitelial branquial contra injúrias e atua como um filtro a fim de agregar uma maior quantidade de substâncias tóxicas diluídas na água por ação do contato direto (Paulino et al. 2012; Rezende et al. 2013). O aumento no número e densidade de células mucosas inibe a perda de água por difusão quando o peixe está fora da

água e a perda iônica quando ele está na água (Varsamos et al. 2005; Moron et al. 2009). Portanto, o aumento do número dessas células pode indicar um potencial estresse estimulado pelo ambiente (Moron et al. 2009).

Neste estudo os animais expostos a 5% HMS apresentaram menor densidade de células mucosas branquiais e menor fluxo iônico na maior densidade (90 peixes/L) quando comparado com grupo controle. Corroborando com o trabalho de (Silva et al. 2017) que encontrou menor densidade de células mucosas nos animais expostos a 5% de hidrolato de *Lippia alba* e conseqüentemente menor fluxo iônico na mesma densidade, quando comparado com o controle. Isso sugere-se, que a exposição ao HMS promoveu a sedação do peixe diminuindo seu metabolismo, uma vez que houve a redução da perda de íons e conseqüentemente menor proliferação de células mucosas branquiais.

Como verificado anteriormente os constituintes químicos majoritários encontrados no OE e HMS foram do tipo sesquiterpenos, os mesmos encontrados nos trabalhos de (Cascaes et al. 2015; Silva et al. 2017; Saccol et al. 2018). Os constituintes majoritários do HMS encontrados neste estudo (beta selineno (12,81%), trans calameneno (11,16%), alfa calacoreno (9,78%) e cadaleno (4,67%) são semelhantes aos apresentados em estudos com OE de *M. sylvatica* no qual foi testado como possível mitigadora de estresse em transporte de juvenis de tambaqui (Saccol et al. 2017b; Saccol et al. 2018). Haja vista que o OE de *M. sylvatica* diminuiu a capacidade de lipoperoxidação e aumentou a atividade de algumas enzimas antioxidantes nos tecidos (Saccol et al. 2016). Os constituintes majoritários encontrados no HMS foram os mesmos vistos no OE, mostrando evidencias do potencial anestésico e sedativo na aqüicultura.

Como não existe anestésico ideal, a escolha deve ser feita de maneira criteriosa, primando pela maior eficácia possível do produto (Baldisserotto et al. 2017) O HMS é um produto de origem natural e com características voláteis, com isso seu efeito residual no ambiente possivelmente diminui, quando exposto. Entretanto este fato necessita de investigação. Este é um subproduto da produção do óleo essencial, geralmente descartado, possui um rendimento muito superior ao óleo e apresentando os mesmos constituintes majoritários outra vantagem que é facilmente diluído em água (não é necessário a diluição em álcool como os óleos essenciais) e que proporcionou rápida recuperação dos juvenis de tambaqui após o transporte.

Conclusão

O uso do HMS na concentração de 5% pode ser recomendado para transporte de juvenis de tambaqui de longa duração 17h. Apesar de não diferir significativamente do grupo controle no percentual de sobrevivência e apresentou baixos valores de oxigênio dissolvido ao final do transporte, todavia apresentou baixas oscilações do pH em todas as densidades de carga e na densidade de 90 peixes/L reduziu o efluxo dos íons de Na^+ e K^+ e Cl^- , e não estimulou a produção de células mucosas branquiais neutras e ácidas na concentração sugerida de 5%. Portanto considera-se que o HMS melhorou o bem-estar animal durante um longo período de transporte (17h) de juvenis de tambaqui. Além disso, o HMS mostrou maior eficácia como sedativo principalmente na maior densidade.

Agradecimento

A Fundação Amazônia Paraense de Amparo a Pesquisa- FAPESPA pelo financiamento e concessão de bolsa de estudo; a Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário da Pesca do Estado do Pará- SEDAP pelo apoio logístico para os experimentos, juntamente com seu corpo técnico na estação de piscicultura de Santa Rosa. Ao LABBEX e Laboratório de Química Multiusuário-UFOPA pelo apoio as análises.

Comitê de ética

Este é um subprojeto do projeto “PRODUTOS NATURAIS COMO ANESTÉSICOS EM PEIXES DA REGIÃO DO OESTE DO PARÁ: CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E SENSORIAIS, e possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Pará (Campus XII - Santarém) Registro nº 42/2012. Todas as manipulações de animais foram realizadas em conformidade com as orientações do comitê de ética mencionado acima.

Rerências

- Adams RP (2006) Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, EUA.
- Arana VL (2010) *Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas*. Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis. 62pp.

- Baldisserotto B, Gomes LC, Heinzmann BM, Cunha MA (2017) Farmacologia aplicada à aquicultura. Santa Maria, RS: Ed.UFSM. 656p.
- Becker A G, Parodi TV, Zeppenfeld CC, Salbego J, Cunha MA, Heldwein CG, Baldisserotto, B (2016) Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: Metabolic and physiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 73–81.
- Becker AG, Carvalho BCF, Silva HNP, Maia JLS, Lobato W, Sousa EMO, Sousa RN, Bezerra RO, Mourão RHV, Silva LVF, Cunha MA, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2015) Óleo essencial de *Lippia alba*: aplicação na aquicultura. In: *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas* (ed. by Tavares-Dias M, Mariano WS). Pedro & João, São Carlos.
- Becker AG, Cunha MA, Garcia LO, Zeppenfeld CC, Parodi TV, Maldaner G, Baldisserotto, B (2013) Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 11: 675–681.
- Becker AG, Parodi TV, Heldwein CG, Zeppenfeld CC, Heinzmann BM, Baldisserotto B (2012) Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38(3): 789-796.
- Boyd CE, Tucker CS(1992).Water quality and pond soil analyses for aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.
- Cascaes MM, Guilhon GMSP, Andrade EHA, Zoghbi MGB, Santos LS (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.
- Colt JE, Tomasso JR (2002) Hatchery Water Supply and Treatment. In: *Fish Hatchery Management* (ed by Wedemeyer GA). American Fisheries Society, Seattle.
- Cunha JA, Scheeren CA, Salbego J, Gressler LT, Madaloz LM, Bandeira Junior G, Bianchini AE, Pinheiro CG, Bordignon SAL, Heinzmann BM, 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.
- Faria RHS, Morais M, Soranna MRGS, Sallum WB (2013) Manual de Criação de peixes em viveiros. Brasília: Codevasf, p.60-62
- Franzener G, Martinez-Franzener AS, Stangarlin JR, Czepak M P, Schwan-Estrata KRF., & Cruz MES (2007) Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina* 28(1): 29–38

- Golombieski JI, Silva LVF, Baldisserotto B, Silva JHS (2003) Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture* 216: 95–102.
- Gomes LC(2003)Protocolo para o Transporte de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Vivo, EMBRAPA, Manaus-AM.
- Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Chippari-Gomes AR, Roubach R (2006a) Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. *Brazilian Journal of Biology* 66: 493-502.
- Gomes LC, Chagas EC, Brinn RP, Roubach R, Coppati CE, Baldisserotto B (2006b) Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* 256:1-4 521-528.
- Gomes LC, Simões LN, Araujo-Lima CARM (2010) Tambaqui (*Colossomamacropomum*). In: *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* (ed. ByBaldisserotto B, Gomes LDC). Editoraufsm, Santa Maria- Rio Grande do Sul, pp. 175-204.
- Guardiola F A, Cuesta A, Esteban MA (2016) Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 59: 323–330.
- Inoue L AKA, Hackbarth A, & Moraes G (2010) Benzocaine on the stress response of matrinxá subjected to transport in plastic bags. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11: 909–918.
- Leira MH, Cunha LT, Braz MS, Melo CCV, Botelho HA, Reghim LS (2017) Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. *PUBVET. Medicina veterinária e zootecnia* 11: 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.
- Mazandarani M, Hoseini SM, Ghomshani MD (2017) Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation. *Aquac. Res.* <http://dx.doi.org/10.1111/are.13400>.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamixs, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9:211–268.
- Mondello, L. 2011. *FFNSC 2: Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*, Mass Spectral Database. John Wiley & Sons Inc.
- Moron SEA, Fernandes CA, Narciso M (2009) Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology* 7 : 491-498.

- Nascimento EM, Furlong J, Pimenta DS, Prata MCA (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.
- Paulino MG, Sakuragui MM, Fernandes MN (2012) Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86 : 1-7.
- Rezende KFO, Santos RM, Santos RM, Shimada JCB, Silva JRMC, Muniz CASD (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* 1:57-68.
- Rosa CS, Veras KS, Silva PR, Lopes Neto JJ, Cardoso HLM, Alves LPL, Brito MCA, Amaral FMM, Maia JGS, Monteiro OS, Moraes DFC (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 :19-26.
- SÁ M V (2012). *Limnocultura: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições UFC.*
- Saccol EM, Toni C, Pês TS, Ourique GM, Gressler LT, Silva LV, Pavanato MA (2016) Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research*48(5): 2012-2031.
- Saccol EMH, Jerez-Cepa I, Ourique GM, Pês TS, Gressler LT, Mourão RHV, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Baldisserotto B, Pavanato MA, Martos-Sitcha JA (2018) *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transpor. *Research in Veterinary Science* 117. pp.150–160.
- Saccol EMH, Londero EP, Bressan CA, Salbego J, Gressler LT, Silva LVF, Mourão RHV, Oliveira RB, Llesuy SF, 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 EMH, Toni C, Pês TS, Ourique GM, Gressler LT, Silva LVF, Mourão RHV, Oliveira RB, Baldisserotto B, Pavanato MA (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.

- Salbego J, Becker AG, Goncalves JF, Menezes CC, Heldwein CG, Spanevello RM, . . . Baldisserotto B (2014) The essential oil from *Lippia alba* induces biochemical stress in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transportation. *Neotropical Ichthyology* 12: 811–818.
- Salbego J, Becker AG, Parodi TV, Zeppenfeld CC, Goncalves JF, Loro VL, . . . Baldisserotto, B (2015) Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 437: 46–50.
- Sampaio FD F, & Freire C A (2016) An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries* 17: 1055–1072.
- Silva HNP, Sousa EMO, Maia JLS, Pinheiro MTL, Lameirão SVOC, Mourão RHV, Maia JGS, Baldisserotto B, Silva LVFS (2017) *Lippia alba* (Verbenaceae) hydrolate as sedative of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles in simulated transport conditions. *Aquac Res.* 00:1–7.
- Silva LA, Sarrazin SLF, Oliveira RB, Suemitsu C, Maia JGS, Mourão RHV (2016) Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants.* 13(3): 1-9.
- Sipaúba-Tavares, L. H. (1994). *Limnologia Aplicada a Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 70p.
- In: Silva ADR, Santos RB, Bruno AMSS, Soares E C(2013) Cultivo de tambaqui em canais de abastecimento sob diferentes densidades de peixes. *Acta Amazônica, Manaus*, vol.43, nº 4
- Souza GS, Bonilla OH, Chaves BE, Lucena EMP, Silva CS (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 35
- Souza KS, Chaar JS, Oliveira KMT, Gomes EO, Portela CN, Pohlit AM, Quihnard ELJ, Nunomura SM, Tadei WP, Mouchrek Filho VE, Silva DD, Galhiane MS, Chierice GO(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* 9: 1-7.
- Sveen LR, Timmerhaus G, Torgersen J S, Ytteborg E, Jørgensen SM, Handeland S, 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.
- Tort I (2011) Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35, pp: 1366-1375.
- Val AL, Gonzalez RJ, Wood CM, Wilson RW, Patrick ML, Bergman HL, Narahara A(1998) Effects of Water pH and Calcium Concentration on Ion Balance in Fish of the Rio Negro, Amazon. *Physiological Zoology* 71: 15-22.

- Verdouw H, Van Echteld C, Dekkers E (1978) Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research* 12: 399-402.
- Zall DM, Fisher D, Garner MQ(1956) Photometric determination of chlorides in water. *Analytical Chemistry* 28: 1665-1668.
- Zoghbi MDGB, Andrade EHA, Silva MHL, Carreira LMM, Maia JGS (2003) Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and fragrance journal* 18 (5) : 421-424.

Considerações Finais

O uso de produtos naturais como fármacos é um campo em ascensão com grandes expectativas de crescimento, principalmente na Amazônia. Esse trabalho é um o primeiro estudo com o uso de hidrolato de *M. sylvatica* com aplicação no transporte de peixes. Destaca-se que há necessidade de mais estudos com essa substância como agente mitigador do estresse em peixes e seus efeitos sobre o animal e ambiente. Enfatizando que esse produto é de fácil manuseio devido ser hidrossolúvel e geralmente é desprezado durante a extração do óleo essencial, possuindo alto rendimento nas extrações. Portanto, sua utilização deve ser considerada devido evidências de suas substâncias bioativas com potencial para uso na produção animal, além de possuir baixo custo devido a ser um resíduo da extração do óleo essencial.

Rerências Bibliográficas

- 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.
- Bittencourt, F.; Souza, B.E.; Boscolo, W.R.; Rorato, R.R.; Feiden, A.; Neu, D.H. 2012. Benzocaína e eugenol como anestésico para quingio (*Carassius auratus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.64, n.6, p.1597-1602.
- 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.
- Bonga, W.S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*,v. 77, p.591-625.

- Brandão, F.R; Gomes, L.C; Crescencio, R; Carvalho, E.S. 2008. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). *Acta Amazônica*, Manaus, v. 38, n. 4, p. 767-772
- Carneiro, P. C. F.; Martins, M. L.; Urbinati, E. C. 2002. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, v.24, n.2, p.555-560.
- 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.
- Cavichiolo, F. 2009. Histologia: ferramenta relevante para estudo em peixes cultiváveis. *In: Tavares-Dias, M. (Eds.). Manejo e Sanidade. EMBRAPA, Macapá-Amapá. p. 602-624.*
- Costas, B.; Conceição, L.E.C.; Aragão, C.; Martos, J.A.; Ruiz-Jarabo, I.; Mancera, J.M.; Afonso, A. 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316: 68-76.
- Cunha, M.A.D.; Silva, B.F.D.; Delunardo, F.A.C.; Benovit, S.C.; Gomes, L.D.C.; Heinzmann, B.M.; Baldisserotto B. 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*, 9, 683-688.
- Dezfuli, B.S.; Squerzanti, S.; Fabbri, S.; Castaldelli, G.; Giari, L., 2010. Cellular response in semi-intensively cultured sea bream gills to *Ergasilus sieboldi* (Copepoda) with emphasis on the distribution, histochemistry and fine structure of mucous cells. *Veterinary Parasitology*, 174 (3–4): 359-365.
- Façanha, M.F.; Gomes, L.C. 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amazonica*, 35 71-75.
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- Franzener, G.; Silva Martinez-Franzener, A.; Stangarlin, J.R.; Czepak, M.P.; Schwan-Estrada K.R.F.; Cruz, M.E.S. 2007. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina: Ciências Agrárias*, 28, 29-38.
- Garcia, L.D.O.; Barcellos, L.J.G.; Baldisserotto B. 2015. Net ion fluxes and ammonia excretion during transport of *Rhamdia quelen* juveniles. *Ciência Rural*, 45, 1854-1858.

- Gomes L.C., Araujo-Lima C.A.R.M., Roubach R. & Urbinati E.C. 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 283-290.
- Gomes, L.C. 2003. Protocolo para o Transporte de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) *Vivo*, EMBRAPA, Manaus-AM.
- Gomes, L.C.; Araujo-Lima, C.A.R.M.; Chippari-Gomes, A.R.; Roubach, R. 2006a. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 493-502.
- Gomes, L.C.; Chippari-Gomes, A.C.; Lopes, N.P. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. W. Aquac. Soc.*, v.32, p.426-431.
- Gomes, L.C.; Golombieski, J. I; Chippari-Gomes, A.C.; Baldisserotto B.1999. Effect of Salt in the Water for Transport on Survival and on Na⁺ and K⁺ Body Levels of Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture*, v.9,p.1-9.
- Gomes, L.C; Chagas, E.C; Brinn,R.P; Roubach, R; Coppati, C.E; Baldisserotto,B. 2006b .Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* 256:1-4, pages 521-528.
- Gonçalves, A.F.N.; Santos, E.C.C.; Fernandes, J.B.K.; Takahashi, L.S. 2008. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 30 (3): 339-344.
- Grottum, J. A.; Staurnes, M.; Sigholt, T. 1997. Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), kept at high densities during transport. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 28, n. 2, p. 159-164.
- Hohlenwerger, J. C; Copatti, C.E; Sena, C.A; Couto, D.R; Baldisserotto, B; Heinzmann, B. M; Caron, B.O; Schmidt, D. 2016. Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)?. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(2), 119-126.
- Hoshiya,M.A; Dias,R.M.S; Moreira, K.M.F; Cunha,L; Geraldo, A.M.R; Tamajusuku, A.S.K. 2015. Clove oil and menthol as anesthetic for platy. *Bol. Inst. Pesca*, v.41, p.737-742.
- Inoue, L. A. K. A.; Neto, C. S.; Moraes, G. 2003. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33, 5 943-947.
- 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, n. 2.

- Maricchiolo, G; Genovese, L. 2011. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. *The Open Marine Biology Journal*, v. 5, n. 1, 2011.
- Mercy, T. A; Malika, V; Sajan, S. 2013. Use of tricaine methanesulfonate (MS-222) to induce anaesthesia in *Puntius denisonii* (Day, 1865)(Teleostei: Cypriniformes: Cyprinidae), a threatened barb of the Western Ghats, India. *Journal of Threatened Taxa*, 5(9), 4414-4419.
- Millezi A.F.; Baptista N.N.; Caixeta D.S.; Rossoni D.F.; Cardoso M.G.; Piccoli R.H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.15, n.3, p.373-379, 2013.
- Nascimento, É.M.;Furlong, J.; Pimenta, D.S.; Prata M.C.D.A. 2009. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. *Ciência Rural*, 39, 817-824.
- Parodi, T.V; Cunha, M.A; Becker, A.G; Zeppenfeld, C.C; Martins, D.I; Koakoski, G; Barcellos, L.G; Heinzmann, B.M; Baldisserotto, B. 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40 (2): 323-334.
- 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.
- Perry, S. F; Capaldo, A. 2011. The autonomic nervous system and chromaffin tissue: neuroendocrine regulation of catecholamine secretion in non-mammalian vertebrates. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 165(1), 54-66.
- Readman, G. D; Owen, S. F; Murrell, J. C; Knowles, T. G. 2013. Do fish perceive anaesthetics as aversive?. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e73773.
- Reverter, M.; Bontemps, N.; Lecchini, D.; Banaigs, B.; Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433 50-61.
- Rocha, A. F; Stech, M. R; Martins, M. F. 2015. Use of eugenol as an anaesthetic for *Geophagus brasiliensis* juveniles. *Boletim do instituto de pesca*, v.41, p. 795-802.
- Rosa, C.; Veras, K.; Silva, P.; Lopes Neto, J. J.; Cardoso, H.; Alves, L.; Moraes, D. 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.; Ross, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.3ª ed. Oxford: Blackwell Science. 240p.

- Roubach, R.; Gomes, L. C.; Fonseca, F. A. L.; Val, L. A. 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36, 1056-1061
- Roubach, R.; Gomes, L.V. 2001. O uso de Anestésico durante o manejo de peixes. *Panorama da Aquicultura*, v.11, p.37-40.
- 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.
- Saccol, E.M.H.; Uczay, J.; Pês, T.S.; Finamor, I.A.; Ourique, G.M.; Riffel, A.P.K.; Schmidt, D.; Caron, B.O.; Heinzmann, B.M.; Llesuy, S.F.; Lazzari, R.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M.A. 2013. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, 416–417 244-254.
- 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.
- Salbego, J; Becker A.G; Parodi T.V; Zeppenfeld C.C; Gonçalves J.F; Loro V.L; Morsch V.M.M; Schetinger M.R.C; Maldaner G; Morel A.F; Baldisserotto B. 2015. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 437, 46-50.
- Sanchez, M.S. S; Rodrigues, R.A; Nunes, A.L; Oliveira, A.M.S; Fantini, L.E; Campos, C.M. 2014. Efeito do mentol e eugenol sobre as respostas fisiológicas do pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 35 (4): 2799- 2808.
- Santos, C. 2009. Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório. *In: Dias, M.T. (Eds.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA, Amapá. p. 13-32.*

- Scherer, R; Wagner, R; Duarte, M.C.T; Godoy, H.T. 2009. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.11, n.4, p.442-449.
- 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.
- 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. D. L; Garlet, Q. I; Koakoski, G; Abreu, M. S. D; Mallmann, C. A; Baldisserotto, B; Heinzmann, B. M. 2015a. Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. *Neotropical Ichthyology*, v. 13 p (4), 715-722
- Silva, L. D. L; Silva, D. T. D; Garlet, Q. I; Cunha, M. A; Mallmann, C. A; Baldisserotto, B; Heinzmann, B. M. 2013a. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Neotropical Ichthyology*, v. 11, n. 2, p. 443-451.
- 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.
- Simões, L. N.; Gomes, L. C. 2009. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. bras. med. vet. zootec*, 61(3), 613-620.
- Soares, B.V; Tavares-Dias, M. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura.-Artigo de Revisão. *Biota Amazônica*, v. 3, n. 1, p. 109-123.
- Soltani, M.; Mohamadian, S.; Ebrahimzahe-Mousavi, H.A.; Mirzargar, S.; Taheri-Mirghaed, A.;Rouholahi, S.; Ghodratnama, M. 2014. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene in *Lactococcus garvieae*, the cause of lactococcosis in farmed fish. *Aquaculture*, 433: 143-147.
- 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.
- 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.
- Takahashi, L.S; Abreu, J.S.D; Biller, J.D; Urbinati, E.C. 2006. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 28 469-475.
- Toni, C; Martos-Sitcha, J. A; Baldisserotto, B; Heinzmann, B. M; de Lima Silva, L; Martínez-Rodríguez, G; Mancera, J. M. 2015. Sedative effect of 2-phenoxyethanol and essential oil of *Lippia alba* on stress response in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Research in veterinary science*, v. 103, p. 20-27.
- Trushenski, J. T; Bowker, J. D; Cooke, S. J; Erdahl, D; Bell, T; MacMillan, J. R; Sharon, S. 2013. Issues Regarding the Use of Sedatives in Fisheries and the Need for Immediate-Release Options. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142(1), 156-170.
- Vidal, L. V. O; Albinati, R. C. B; dos Santos Neto, E. B; de Deus, B. T; Albinati, A. C. L. 2007. Influência do peso de juvenis de matrinxã *Brycon cephalus* e tambaqui *Colossoma macropomum* à ação anestésica do eugenol. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 8(3).
- Zahl, I.H; Kiessling, A; Samuelsen, O.B; Olsen R.E. 2010. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 719-730.
- Zahl, I.H; Samuelsen, O; Kiessling, A. 2012. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38 (1): 201-218.
- Zeppenfeld, C.C; Toni, C; Becker, A.G; Dos Santos Miron, D; Parodi, T.V; Heinzmann, B.M; Barcellos, L.J.G; Koakoski, G; Da Rosa, J.G.S; Loro, V.L. 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*, v. 418, p.101-107.
- Zoghbi, M. D. G. B.; Andrade, E. H. A.; da Silva, M. H. L.; Carreira, L. M. M.; Maia, J. G. S. 2003. Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and fragrance journal*, 18(5), 421-424.

Anexo A

Normas para submissão de artigo para revista *Aquaculture International*. Esta revista possui o fator de impacto 1.095 e qualis-CAPES B1 na área de Biodiversidade.

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *Aquaculture International* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://aqui.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *Aquaculture International* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Springer offers two options for reproducing colour illustrations in your article. Please let us know what you prefer: 1) Free online colour. The colour figure will only appear in colour on www.springer.com and not in the printed version of the journal. 2) Online and printed colour. The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of the journal. The charges are EUR 950/USD 1150 per article.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Reviewing Procedure

Aquaculture International is sent to 2 specialist reviewers who remain anonymous unless they specifically choose to confer with the author.

Manuscript Presentation

Manuscripts should all be presented in the accepted scientific format e.a. Introduction, Materials and Methods etc. There is no separate format for short communication. The journal's language is English.

British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should leave adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing: running head (shortened title) Title author(s) affiliation(s) full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Abstract

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.).

Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a

detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples: Winograd (1986)(Winograd 1986; Flores et al. 1988)(Bullen and Bennett 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn.Wiley, New York

6. Book, authored:South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E.Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction*.Handbook of experimental armacology, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R(eds) *PRICAI'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence,Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):Aaron M (1999) *The future of genomics*. In: Williams H (ed) *Proceedings of the genomic researchers*,Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: *Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrialmicroorganisms*, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented

at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation: Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book): International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica*. Excerpta Medica, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication: Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication: The English translation is optional. Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya strukturapolimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers) Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version) Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s001090000086

20. Internet publication/Online document Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998 Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000 University site Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni->

heidelberg.de/mydata.html. Cited 25 Dec 1999 FTP site Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-es/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author. One corrected proof, together with the original, edited manuscript, should be returned to the Publisher within three days of receipt by mail (airmail overseas).

Offprints

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are published at the author's expense only.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher.

This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit <http://www.springer.com/openchoice> to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Aquaculture International

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: 78-6576377

Internet: <http://www.springer.com/>

Anexo B- Autorização do Comitê de Ética

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^º. 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
Paraná 2011/CCBS

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