

DÉBORA WERNECK CALDAS

**ÓLEO DE CAPIM LIMÃO, *Cymbopogon flexuosus*, COMO ANESTÉSICO PARA  
TETRA NEGRO, *Gymnocorymbus ternetzi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Caldas, Débora Werneck, 1992-  
C145o Óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, como  
2018 anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi* / Débora  
Werneck Caldas. – Viçosa, MG, 2018.  
xiv, 23 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 17-21.

1. *Gymnocorymbus ternetzi*. 2. Peixes ornamentais.  
3. Mortalidade. 4. Anestésicos. 5. Óleos vegetais. 6.  
*Cymbopogon flexuosus*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

DÉBORA WERNECK CALDAS

**ÓLEO DE CAPIM LIMÃO, *Cymbopogon flexuosus*, COMO ANESTÉSICO PARA  
TETRA NEGRO, *Gymnocorymbus ternetzi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Ana Lúcia Salaro  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Graziela Domingues de Almeida Lima

  
\_\_\_\_\_  
Jener Alexandre Sampaio Zuanon  
(Orientador)

***“Nenhum de nós é tão forte quanto  
todos nós juntos!”***

*Ray Croc*

*Dedico primeiramente à minha avó, **Eudith Mendes da Rocha**  
Por tornar meus estudos no Santo Agostinho e na UFV possíveis na minha vida.*

*Dedico aos meus pais, **Mauro Teixeira Caldas e Deise Maria Werneck Teixeira**  
Pela minha criação, por me mostrarem que não precisamos de muito para sermos muito  
felizes, pelo exemplo de honestidade, força, família e humanidade.*

*Dedico aos meus avós **Concesso da Silveira Caldas, Ivone Teixeira Caldas e Carlos  
Werneck da Rocha**  
Pelo apoio, suporte, amor, pelo exemplo de vida, família e respeito.*

*Dedico ao meu orientador **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**  
Por todo o apoio, paciência, confiança, conselhos, compreensão, amizade,  
e pelo exemplo de profissional.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, base da vida e da minha força, por me amparar nos momentos que mais precisei e me iluminar sempre, protegendo e guiando por todos os meus caminhos, sem nunca me abandonar e me dando cada vez mais fé.

À **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por toda educação e estrutura que possibilita nosso estudo e vivência.

Ao **Departamento de Biologia Animal (DBA-UFV)** pela oportunidade de crescimento não só com a Pós-Graduação mas também com a representação discente na Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, meu orientador, por toda a paciência frente as adversidades, por todo apoio, compreensão e conversas que, sem elas, não conseguiríamos nossas conquistas. Por todas as vezes que puxou minha orelha da forma mais sutil possível, pois foi graças a elas que eu cresci tanto. Por ser pai quando precisei e não tinha o colo que tanto queria por perto, cuidando, preocupando e apoiando, assim como meus próprios pais fariam. Pela amizade e risadas em momentos descontraídos, que sempre deixaram tudo mais leve e mais fácil de ser levado. Pelo exemplo de profissional íntegro e justo (que algumas vezes faltam dentro de diversas profissões), exemplo de honestidade, bondade, cuidado e humanidade. Muito, muito obrigada!

À **Profª. Drª. Ana Lúcia Salaro**, minha coorientadora, pelos ensinamentos, risadas, conversas, apoio e carinho. Por se preocupar com nosso futuro e formação, que me fizeram crescer e ter mais responsabilidade com uma série de coisas. Por sempre deixar o laboratório, estrutura e equipamentos sempre a disposição para realizar meus experimentos, isso foi fundamental para minha formação na Universidade. Pela troca de conhecimentos e ideias, fundamentais para a realização dos meus experimentos. Muito obrigada, Ana!

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, **Ana Lúcia Salaro** e **Graziela Domingues Almeida Lima**, pelos comentários e sugestões valiosos para a minha dissertação.

Aos funcionários do DBA-UFV e do Setor de Piscicultura da UFV, sem os quais o departamento e, conseqüentemente, nossos trabalhos, não funcionariam. Ao **Adnilson Brasileiro, Lúcia Helena Campos, Nilo Souza, Donizete Aparecido Silva, José Geraldo Alvez, Geraldo Pereira Filho e Simone Gomes Duarte Moura**, meu muito obrigada por toda ajuda.

Aos meus pais, **Deise Maria Werneck Teixeira e Mauro Teixeira Caldas** pela criação exemplar e educação ímpar. Pela disciplina e perseverança que me ensinaram e nunca foram tão fundamentais como agora. Pelos melhores momentos da minha vida, pelos melhores conselhos e melhores abraços. Pela minha maior saudade. Pelo melhor exemplo de casal, de pais, de família e companheirismo que eu poderia ter, me ensinando que crescer junto é muito melhor do que sozinho. Por todo apoio, lágrimas compartilhadas, abraços (mesmo que em pensamento, as vezes), ligações, risadas, preocupações, por muitas vezes sentirem em vocês a minha dor e minha alegria e conseguir entendê-las tão bem. Por serem os melhores pais que eu poderia ter, os maiores companheiros e amigos que tenho, e os maiores amores da minha vida, muito obrigada!

À minha avó, **Eudith Mendes da Rocha**, por todas as brincadeiras, risadas e caduquices. Por todo o apoio durante a minha formação, desde o ensino médio, sem o qual eu não teria chegado até aqui. Pelo “banco do brasil”, que muitas vezes financiou minhas aventuras. Por aguentar as vezes meu mau humor e meus acessos de felicidade. Ao meu avô **Concesso da Silveira Caldas**, pelo exemplo de homem, honestidade e respeito. Por todo apoio, carinho, conhecimento, conversas e amor. Por ser meu segundo pai em diversos momentos da vida, e por ser meu grande avô. À minha avó **Ivone Teixeira Caldas** pelo suporte, pela ajuda, pelas risadas, pelos abraços acolhedores e pelos melhores pratos do mundo, que me fazem ter tanta saudade de casa e me fazem tão feliz quando estou em casa além do exemplo de esposa e mãe. E ao meu avô **Carlos Werneck da Rocha**, o eterno vovô Werneck que nos deixou tão cedo e com tanta saudade. Por ter sido o homem que é, com os valores e qualidades que só ele tem. Por ter nos que a vida pode ser leve, apesar das adversidades. Eu amo vocês demais! E vocês são minha saudade diária!

À minha **família** por todo apoio, carinho, compreensão, paciência, ligações, pela recepção única a cada vez que vou pra BH, pelo amor que dedicam a mim, pelo apoio aos meus pais quando estou ausente, pelos conselhos, por sermos tão semelhantes e tão diferentes

que é o que faz da nossa família a melhor que existe, e pelas risadas e abraços. Vocês são muito importantes pra mim e para minha formação como ser humano.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP), eternos Lafapíneos, que não foram apenas colegas de mestrado e estagiários, mas foram amigos, **Pollyanna de Moraes França Ferreira, Maria Tatiana Soares Martins, Juliana Rodrigues Gomes, Alex Junio da Silva Cardoso, Wanderson Valente dos Santos, Jheneze Guimarães Pereira Rocha, Karina Ventura Boechat Martins, Luana Belique Ruy, Felipe Martins dos Santos, Filipe Silveira Azevedo, Suêmea Soares Costa, Matheus Ferreira Grossi, Sedy Moreira Reis e Isabel Gertrudes Arrighi de Araújo Neves**, que sempre me deram suporte quando precisei, ajudando a cuidar dos meus peixes, ajudando nos meus experimentos, nas análises e muitas vezes na escrita.

Aos amigos mais lindos que pude ter durante o tempo em Viçosa, **Roberta Fonseca de Oliveira Pereira, Agatha Fialho Fumiã, Gabriela Zorzal Neves, Mayara Luiza Rocha Freitas, Juliana Lívia Vieira, Lívia Vieira Nunes, Débora Mello Furtado de Mendonça, Luiza Amaral Maciel Braga, Augusto Vellozo Gonçalves e Brenda Vila Nova Santana**, que foram minha família, meus irmãos, pais, amigos, professores, porto seguro, e muitas outras coisas e que, com certeza, fizeram Viçosa mais colorida e mais viva. Levarei vocês comigo pra onde eu for!

Aos amigos do Colégio Santo Agostinho, que são tão importantes pra mim, me conhecem melhor do que ninguém, me acompanharam em todos os momentos, sejam bons ou ruins, e me acompanham até hoje, **Ana Clara Oliveira Pelaes, Sara Costa Dolangelo, Mariana Augusta Faleiro Borges, Fabiana Barbosa de Jesus, Henrique de Melo Silva e Guilherme Lucas Campos Pereira**.

Aos amigos da vida, que Deus pôs ao meu lado sei lá quando e continuam comigo incondicionalmente, que são tão importantes pra mim, que me apoiam, me ajudam, riem e choram comigo, e são grandes amores na minha vida, **Jamile Samrout Vieira e Bruno Alberto Barbosa Detomi**.

À **Lua**, meu pedacinho de céu na terra, meu anjinho da guarda que me acalma, me alegra, às vezes me irrita, mas ainda assim me ama muito e pela qual tenho um amor incondicional. Por ter aparecido na minha vida e trazido alegria e agitação, além das melhores

recepções, e ter me mostrado o amor de uma forma que nunca tinha sentido antes, e que ele pode estar nas menores pessoinhas e nos menores detalhes, muito obrigada!

Enfim, a todos que fizeram dessa jornada mais leve, alegre e mais fácil. Que sempre me apoiaram, me ajudaram, me ampararam e me guiaram pelos caminhos tortuosos que foram esses dois anos. Que iluminaram meus dias e noites, fazendo-me sentir amada, querida, e fazendo-me extremamente feliz! Obrigada por fazerem parte da minha vida, cada um com seu jeitinho, cada um com seu pedacinho no meu coração, e todos com tanto amor e carinho! Todos, citados aqui ou não, são muito importantes pra mim! Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>ARTIGO</b> .....	1
<b>RESUMO</b> .....	2
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	5
<b>Experimento 1 – Eficácia do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro</b> .....	6
<b>Experimento 2 – Segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro por exposição curta (5 minutos)</b> .....	7
<b>Experimento 3 – Segurança do óleo de capim limão como anestésico e sedativo para tetra negro por exposição prolongada (24h)</b> .....	7
<b>Análises Estatísticas</b> .....	8
<b>RESULTADOS</b> .....	9
<b>Experimento 1 – Eficácia do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro</b> .....	9
<b>Experimento 2 – Segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro por exposição curta (5 minutos)</b> .....	11
<b>Experimento 3 – Segurança do óleo de capim limão como anestésico e sedativo para tetra negro por exposição prolongada (24h)</b> .....	12
<b>DISCUSSÃO</b> .....	13
<b>CONCLUSÕES</b> .....	16
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>ANEXO</b> .....	22
<b>Anexo 1 – Certificado de aprovação do comitê de ética</b> .....	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características comportamentais referentes aos estágios de anestesia e recuperação conforme descrito por Woody et. al. (2002).....	6
Tabela 2. Valores médios do tempo (s) necessário para indução e para recuperação da anestesia de tetra negro, <i>Gymnocorymbus ternetzi</i> submetidos a diferentes concentrações do óleo de capim limão, <i>Cymbopogon flexuosus</i> . ....	9
Tabela 3. Valores médios de glicose sanguínea de tetra negro, <i>Gymnocorymbus ternetzi</i> submetidos à anestesia em diferentes concentrações do óleo de capim limão, <i>Cymbopogon flexuosus</i> . ....	10
Tabela 4. Valores médios de taxa de mortalidade de <i>Gymnocorymbus ternetzi</i> submetidos à anestesia com diferentes concentrações de óleo de capim limão, <i>Cymbopogon flexuosus</i> , durante a avaliação da segurança do óleo.....	11
Tabela 5. Valores médios de taxa de mortalidade de <i>Gymnocorymbus ternetzi</i> submetidos à anestesia com diferentes concentrações de óleo de capim limão, <i>Cymbopogon flexuosus</i> , durante a avaliação da segurança do óleo.....	12

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tempo médio de indução à anestesia de *G. ternetzi* submetidos a diferentes concentrações de óleo de capim limão. .... 10

Figura 2. Valores médios de glicose sanguínea de *G. ternetzi* submetidos a anestesia com óleo de capim limão. .... 11

## RESUMO

CALDAS, Débora Werneck, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2018. **Óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus* como anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi***. Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro, Pollyanna de Moraes França Ferreira e Suellen Silva Condessa.

Os manejos de captura, biometria, classificação e transporte desencadeiam respostas de estresse em peixes, como o aumento de cortisol, hiperglicemia, hiperlactacemia, aumento da ventilação branquial, distúrbios iônicos e metabólicos e redução da pigmentação da pele. A redução das repostas de estresse pode ser alcançada por boas práticas de manejo e pela utilização de aditivos na água como probióticos, sequestradores de amônia, sal comum e anestésicos/sedativos. Os anestésicos sintéticos são eficazes durante os manejos da criação e o transporte de peixes porém, podem causar perda de muco, irritação de brânquias e córneas, além da difícil obtenção e do custo relativamente alto. Dessa forma, é necessário avaliar produtos naturais, como óleos essenciais derivados de plantas, que sejam eficazes, seguros e redutores das respostas de estresse em peixes. Dentre óleos essenciais com potencial para serem usados como anestésico para peixes destaca-se o capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, em função de suas propriedades ansiolítica, calmante e anestésica. O tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi* é uma espécie ornamental que, quando submetida aos manejos de rotina na criação de peixes apresenta respostas de estresse, evidenciadas pela redução da pigmentação da pele e consequente redução do valor de mercado. Com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro foram realizados três experimentos. O primeiro experimento foi realizado para avaliar a eficácia do óleo de capim limão como anestésico, sendo mensurados os tempos de indução e recuperação da anestesia. Os peixes foram individualmente submetidos às concentrações de 0; 25; 50; 75; 100; 150 e 200mg/L de óleo de capim limão na água, além de um controle positivo com álcool etílico absoluto (3.600 mg/L). Após a indução à anestesia foi realizada biometria dos peixes (peso e comprimento) para simular situação de estresse que os peixes são comumente expostos durante os manejos de rotina na criação. O segundo experimento foi realizado para avaliar a segurança do óleo de capim limão durante exposição curta (5 min) em que os peixes foram individualmente expostos às mesmas concentrações do primeiro experimento. O terceiro experimento foi realizado para avaliar a segurança do óleo de capim limão por exposição prolongada (24h), em que foram utilizadas as concentrações de 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 mg/L. O tempo de indução à anestesia apresentou redução dose dependente, com

a menor concentração estimada que induz anestesia profunda de 68 mg/L. O tempo de recuperação da anestesia não foi influenciado pelas concentrações de óleo de capim limão avaliadas. A glicose sanguínea após a anestesia apresentou redução dose dependente, o que indica provável efeito redutor das respostas de estresse. Durante exposição curta, o óleo de capim limão causou 20% de mortalidade dos peixes na concentração de 100 mg/L e 100% a partir da concentração de 150 mg/L. Durante exposição prolongada o óleo de capim limão causou mortalidade de 100% dos peixes em concentrações a partir de 10 mg/L. Portanto, o óleo de capim limão é eficaz como anestésico para tetra negro, e seguro em concentrações de até 75 mg/l durante exposição curta e 5 mg/L durante exposição prolongada. Concentrações a partir de 150 mg/L podem ser utilizadas para eutanásia de peixes.

## ABSTRACT

CALDAS, Débora Werneck, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. **Lemongrass oil, *Cymbopogon flexuosus* as anesthetic for black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi*.** Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisers: Ana Lúcia Salaro, Pollyanna de Moraes França Ferreira and Suellen Silva Condessa.

Capture, biometry, sorting and transport can cause stress responses in fish, such as cortisol increasement, hyperglycemia, hyperlactaemia, branchial ventilation increasement, ionic and metabolic disorders and reduction of skin pigmentation. Reducing stress responses can be achieved by good management practices and the use of additives in the water, such as probiotics, ammonia removal, common salt and anesthetics / sedatives. Synthetic anesthetics are effective during fish farming and transport, but can cause mucus loss, irritation of gills and corneas, are also high cost and difficult to obtain. In this way, it is necessary to evaluate natural products, such as essential oils extracted from plants, that are effective, safe and reducer of stress responses in fish. Among essential oils with potential to be used as an anesthetic for fish, lemongrass, *Cymbopogon flexuosus*, stands out due to its anxiolytic, calming and anesthetic properties. The black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi* is an ornamental fish species that, when exposed to routine management in fish farming, presents stress responses evidenced by the reduction of skin pigmentation and consequent reduction of market value. In order to evaluate the efficacy and safety of lemongrass oil as an anesthetic for black tetra, three experiments were conducted. The first experiment evaluated the efficacy of lemongrass oil as an anesthetic, and the induction and recovery times of anesthesia were measured. Fish were individually submitted to concentrations of 0; 25; 50; 75; 100; 150 and 200mg/L of lemongrass oil in the water, and a positive control with absolute ethyl alcohol (3,600 mg/L). After induction to anesthesia, fish biometry (weight and length) was performed to simulate the stress situation that fish are commonly exposed during routine management at fish farming. The second experiment evaluated the safety of lemongrass oil during short exposure (5 min) in which fish were individually exposed to the same concentrations of the first experiment. The third experiment evaluated the safety of lemongrass oil by prolonged exposure (24h), using concentrations of 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 and 70 mg/L. The time of induction to anesthesia showed dose-dependent reduction, with the lowest estimated concentration inducing deep anesthesia of 68 mg/L. The recovery time of anesthesia was not influenced by the concentrations of lemongrass evaluated. Blood glucose after anesthesia showed dose-dependent reduction, indicating possible reducing effect of stress responses.

During short exposure, lemongrass oil caused 20% fish mortality at 100 mg/L and 100% at 150 mg/L. During prolonged exposure the lemongrass oil caused 100% mortality of the fish in concentrations starting at 10 mg/L. Therefore, lemongrass oil is effective as an anesthetic for black tetra, and safe in concentrations up to 75 mg/L during short exposure and 5 mg/L during prolonged exposure. Concentrations from 150 mg/L can be used for fish euthanasia.

**ARTIGO**

ÓLEO DE CAPIM LIMÃO, *Cymbopogon flexuosus*, COMO ANESTÉSICO PARA TETRA  
NEGRO, *Gymnocorymbus ternetzi*

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do óleo de capim limão (OCL), *Cymbopogon flexuosus*, como anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi*, foram realizados três experimentos. No primeiro experimento, os peixes foram expostos às concentrações de 0; 25; 50; 75; 100; 150 e 200mg/L de OCL na água para avaliar os tempos de indução e recuperação da anestesia e a concentração de glicose sanguínea. No segundo experimento, foram usadas as mesmas concentrações citadas anteriormente para avaliar a segurança do OCL por exposição curta (5 minutos), e no terceiro experimento foram utilizadas as concentrações de 0; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70mg/L por exposição prolongada (24h). O tempo de indução à anestesia apresentou redução dose dependente, com a menor concentração estimada que induz anestesia profunda de 68mg/L. O tempo de recuperação da anestesia não foi influenciado pelas concentrações de OCL avaliadas. A glicose sanguínea após a anestesia apresentou redução dose dependente, o que indica provável efeito redutor das respostas de estresse. Após exposição por 5 min houve mortalidade dos peixes à partir de 100mg/L e após exposição prolongada à partir de 10mg/L. Portanto, o OCL é eficaz como anestésico para *G. ternetzi* e seguro em concentrações de até 75 mg/l durante exposição curta e 5mg/L durante exposição prolongada. Concentrações a partir de 150mg/L podem ser utilizadas para eutanásia de peixes.

Palavras-chave: dose letal, mortalidade, peixes ornamentais, sedação

## INTRODUÇÃO

Os manejos de captura, biometria, classificação, exposição ao ar e transporte desencadeiam respostas de estresse em peixes cultivados, como o aumento de cortisol (Mariano, Oba, Santos, & Fernandes, 2009; Oba, Mariano, & Santos, 2009; Vargas-Chacoff et al., 2014; Yarahmadi, Miandare, Fayaz, & Caipang, 2016), hiperglicemia (Mariano et al., 2009), hiperlactacemia (Mariano et al., 2009; Yarahmadi et al., 2016), aumento da ventilação branquial (Rodrigo Egydio Barreto & Volpato, 2004, 2006, 2011) e distúrbios iônicos e metabólicos (Barbosa et al., 2010; Carvalho & Fernandes, 2006; Fernandes Junior et al., 2010; Ferreira & Matsubara, 1997; Mariano et al., 2009; Vargas-Chacoff et al., 2014; Yarahmadi et al., 2016). A exposição prolongada a fatores estressores causa redução no crescimento, na reprodução, imunodepressão, aumento à susceptibilidade a patógenos e, conseqüentemente, perdas por mortalidade e redução da sustentabilidade econômica da criação de peixes de corte e ornamentais (Rodrigo E. Barreto & Volpato, 2011; Pickering & Pottinger, 1989; Yarahmadi et al., 2016). Um dos principais fatores determinantes do valor de mercado dos peixes ornamentais é a coloração da pele, comumente reduzida pela exposição a fatores estressores (Kittilsen et al., 2009; Rotllant et al., 2003; Van Der Salm, Martínez, Flik, & Wendelaar Bonga, 2004), o que também contribui para a redução da lucratividade da atividade.

Diversas práticas têm sido empregadas a fim de reduzir as respostas de estresse decorrentes do manejo na criação, como a utilização de aditivos na água. Os aditivos usados são probióticos, que reduzem as respostas de estresse e a susceptibilidade a patógenos (Rollo et al., 2006; Wang, 2007; Yanbo & Zirong, 2006; Zhou, Tian, Wang, & Li, 2010), o sal comum usado para reduzir distúrbios osmóticos e iônicos (Carneiro & Urbinati, 2001; Crosby et al., 2006; Oyoo-Okoth et al., 2011; Ramírez-Duarte et al., 2011; Tacchi et al., 2015), os sequestradores de amônia (Ramírez-Duarte et al., 2011; Singh, Vartak, Balange, & Ghughuskar, 2004) e os anestésicos usados para redução da atividade natatória e metabólica (Inoue et al., 2003; Oliveira et al., 2009) e conseqüente redução do consumo de O<sub>2</sub>, da excreção de CO<sub>2</sub> e de amônia (Pramod, Sajeevan, Ramachandran, Thampy, & Pai, 2010).

Os principais anestésicos utilizados durante os manejos da criação e transporte de peixes são a tricafina metano sulfonado (MS-222), a benzocaína e o 2-fenoxietanol (Altun & Danabas, 2006; Fabiani et al., 2013; Mitjana et al., 2014; Oliveira et al., 2009; Velíšek, Svobodová, & Piačková, 2007). Porém, essas substâncias causam efeitos indesejados como

perda de muco, irritação de brânquias e córneas (Hill, Davison, & Forster, 2002; Inoue, Santos Neto, & Moraes, 2003a; Iwama, McGeer, & Pawluk, 1989; Velíšek & Svobodová, 2004), além da difícil obtenção e do custo relativamente alto (Hovda & Linley, 2000). Dessa forma, é necessário avaliar produtos naturais, como óleos essenciais derivados de plantas, que sejam eficazes, seguros e redutores das respostas de estresse em peixes.

Dentre óleos essenciais com potencial para serem usados como anestésico para peixes destaca-se o *Cymbopogon flexuosus*, comumente conhecido como capim limão, capim cidreira, capim santo ou erva príncipe. Extratos das raízes e partes aéreas da planta são utilizados como aromatizante na indústria alimentícia, em massagens e na medicina alternativa em função de suas propriedades ansiolítica, anticonvulsivante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicêmica, hipolipidêmica, antimicrobiana, espasmolítica, cardioprotetora, diurética, calmante e anestésica (Adeneye & Agbaje, 2007; Blanco, Costa, Freire, Santos, & Costa, 2009; Carbajal, Casaco, Arruzazabala, Gonzalez, & Tolon, 1989; DEVI, Mui SIM, & Ismail, 2011; Gayathri, Jayachandran, Vasanthi, & Rajamanickam, 2010; Viana, Vale, Pinho, & Matos, 2000). O principal componente do óleo de capim limão é o citral, um monoterpreno composto de uma mistura dos esteroisômeros geranial, neral e beta-mirceno (Blanco et al., 2009; Lorenzetti, Souza, Sarti, Santos Filho, & Ferreira, 1991).

O *Gymnocorymbus ternetzi*, conhecido como tetra negro é uma espécie ornamental que, quando submetida aos manejos de captura, exposição ao ar, classificação e transporte apresenta respostas de estresse evidenciadas pela redução da pigmentação da pele e consequente redução do valor de mercado.

Dessa forma, objetivamos avaliar a eficácia e segurança do óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, como anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa CEUAp/UFV, protocolo nº 055/2017 (Anexo 1), estando de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e com a legislação vigente.

Foram realizados três experimentos em delineamento inteiramente casualizado, conduzidos no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (LAFAP - DBA/UFV). O primeiro experimento foi realizado para avaliar a eficácia do óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, como anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; o segundo foi realizado para avaliar a segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro durante exposição curta (5 minutos) e o terceiro foi realizado para avaliar a segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro durante exposição prolongada (24h). No primeiro e segundo experimentos foram avaliadas oito concentrações de óleo de capim limão e 10 repetições, sendo cada peixe considerado uma repetição; e no terceiro experimento foram avaliados nove concentrações de óleo de capim limão e três repetições, sendo cada aquário considerado uma repetição.

Juvenis de *G. ternetzi* com comprimento médio de  $3,26\text{cm} \pm 0,32\text{cm}$  e peso médio de  $1,73\text{g} \pm 0,87\text{g}$  foram obtidos de uma piscicultura ornamental localizada no município de São Francisco do Glória – MG, Brasil e foram transferidos para o e mantidos para aclimação por 15 dias em caixas plásticas de 250L com filtro biológico, aeração e temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$  mantida por aquecedores e termostato. Os peixes foram alimentados com ração comercial (36% PB) três vezes ao dia. Antes da realização de cada experimento, os peixes foram submetidos a jejum de 12h.

Como o óleo de capim limão apresenta baixa solubilidade em água, para a obtenção das concentrações teste foi preparada uma solução estoque do óleo diluído em álcool etílico absoluto (solução estoque 10% - 100mg de óleo/g de álcool). Para se obter as concentrações de óleo de capim limão a serem avaliadas, diferentes quantidades da solução estoque foram diluídas na água do aquário de anestesia. O óleo de capim limão utilizado nos três experimentos continha o citral como principal componente (73%), sendo 41% de geranial e 32% de neral (BioEssência®).

### **Experimento 1: Eficácia do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro**

Foram testadas as concentrações 0, 25, 50, 75, 100, 150 e 200mg/L de óleo de capim limão, além de um tratamento com apenas álcool etílico absoluto. A quantidade de álcool utilizada foi calculada com base na quantidade de álcool presente na maior concentração de óleo de capim limão testada.

Dois aquários de vidro com volume útil de 10L de água foram utilizados, sendo um para indução à anestesia e outro para recuperação da anestesia. Os aquários foram mantidos com aeração por meio de compressor de ar, e temperatura constante (25°C) por meio de aquecedor e termostato. Durante os procedimentos, o óleo de capim limão foi adicionado ao aquário de anestesia em concentrações crescentes, e a cada concentração testada os dois aquários foram esvaziados e limpos. Foram utilizados os critérios estabelecidos por Woody, Nelson, & Ramstad (2002) para considerar o estágio de anestesia profunda (estágio 4) e recuperação dos peixes (tabela 1).

Tabela 1. Características comportamentais referentes aos estágios de anestesia e recuperação conforme descrito por Woody et. al. (2002).

Estágio	Característica comportamental
1	Movimento opercular visivelmente lento ou errático.
2	Perda esporádica de equilíbrio, dificuldade de se manter na posição vertical.
3	Completa perda de equilíbrio, incapacidade de recuperar a posição vertical.
4	Sem reação a estímulo tátil.
Recuperação	Habilidade de permanecer na posição vertical com recuperação da capacidade de nadar.

O tempo de indução e recuperação da anestesia foi monitorado individualmente em 10 peixes/tratamento. Ao atingirem o estágio de anestesia profunda, os peixes foram retirados do aquário de indução e, para simular situações de estresse causadas pelas biometrias realizadas nas pisciculturas, foram pesados e medidos. Em seguida, os peixes foram transferidos para o

aquário de recuperação até a recuperação da capacidade de nadar. Após a recuperação da anestesia, os peixes foram transferidos para aquários de polietileno de 35L, sem anestésico e com aeração e temperatura constante (25°C) para o monitoramento da mortalidade durante 96h.

Para a avaliação das respostas de estresse, os procedimentos de anestesia citados anteriormente foram realizados em outros três peixes. Imediatamente após atingirem o estágio de anestesia profunda, foi realizado um corte no pedúnculo caudal com bisturi heparinizado e o sangue foi depositado em tira reagente do aparelho monitor digital Accutrend® Plus Roche para quantificação da glicose sanguínea.

### **Experimento 2: Segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro durante exposição curta (5 minutos)**

Em procedimentos de anestesia nas pisciculturas, muitas vezes os animais ficam expostos ao anestésico por mais tempo do que o necessário para atingir os estágios desejados. Sendo assim, é necessário avaliar a segurança do uso do óleo de capim limão por um período de 5 minutos (Zahl, Kiessling, Samuelsen, & Hansen, 2009). Para tanto, 10 peixes foram individualmente anestesiados nos mesmos aquários e tratamentos utilizados no experimento 1 e a mortalidade dos peixes foi monitorada. Após a recuperação da anestesia, os peixes foram transferidos para aquários de polietileno de 35L, sem anestésico e com aeração e temperatura constante (25°C) para o monitoramento da mortalidade durante 96h.

### **Experimento 3: Segurança do óleo de capim limão como sedativo e anestésico para tetra negro durante exposição prolongada (24h)**

Durante o transporte de peixes ornamentais, os mesmos são expostos a fatores estressores que podem causar perdas por mortalidade. Portanto, é necessário avaliar o uso de substâncias anestésicas em baixas concentrações (efeito sedativo) durante períodos prolongados de exposição, uma vez que altas concentrações podem causar mortalidade dos peixes. Para tanto, os peixes foram alojados em 27 aquários de polietileno contendo 25L de água (20 peixes/aquário) e expostos às concentrações 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, e 70mg/L de óleo de capim limão, que foram definidas com base nos resultados do experimento 2. A mortalidade dos peixes foi monitorada ao final de 24h. Nas primeiras 12h de exposição, a mortalidade foi monitorada a cada hora.

### **Análises estatísticas**

A avaliação dos efeitos do óleo de capim limão sobre as variáveis avaliadas, nos três experimentos, foi realizada por meio de análise de variância e regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Para escolha do modelo de regressão foi considerado a significância dos coeficientes de regressão, o comportamento das variáveis em estudo e a magnitude dos coeficientes de determinação

## RESULTADOS

### Experimento 1: Eficácia do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro

Na concentração de 25mg/L houve diminuição dos batimentos operculares e redução da atividade natatória, porém os peixes mantiveram a capacidade de responder aos estímulos, indicando que não foi atingida a anestesia profunda em tempo menor que 5 minutos. A partir da concentração de 50mg/L, os peixes atingiram o estágio de anestesia profunda, com efeito linear decrescente ( $p < 0,05$ ) do capim limão no tempo de indução (Tabela 2; Figura. 1). O óleo de capim limão não apresentou efeito significativo no tempo de recuperação dos peixes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do tempo (s) necessário para indução e para recuperação da anestesia de tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi* submetidos a diferentes concentrações do óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*.

Tempo (min)	Óleo de capim limão (mg/L)						CV(%)	
	0	25	50	75	100	150		
Anestesia*	> 5 min	> 5 min	3,4	3,02	2,21	1,29	0,73	27,62
Recuperação <sup>ns</sup>	> 5 min	> 5 min	4,51	3,44	4,34	3,4	3,21	23,06

CV – Coeficiente de variação.

- O tempo de indução a anestesia excedeu cinco minutos e, portanto, foi considerada ineficaz.

\*  $Y = 4,2595 - 0,0185x$  ( $R^2 = 0,9739$ ).

ns – não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

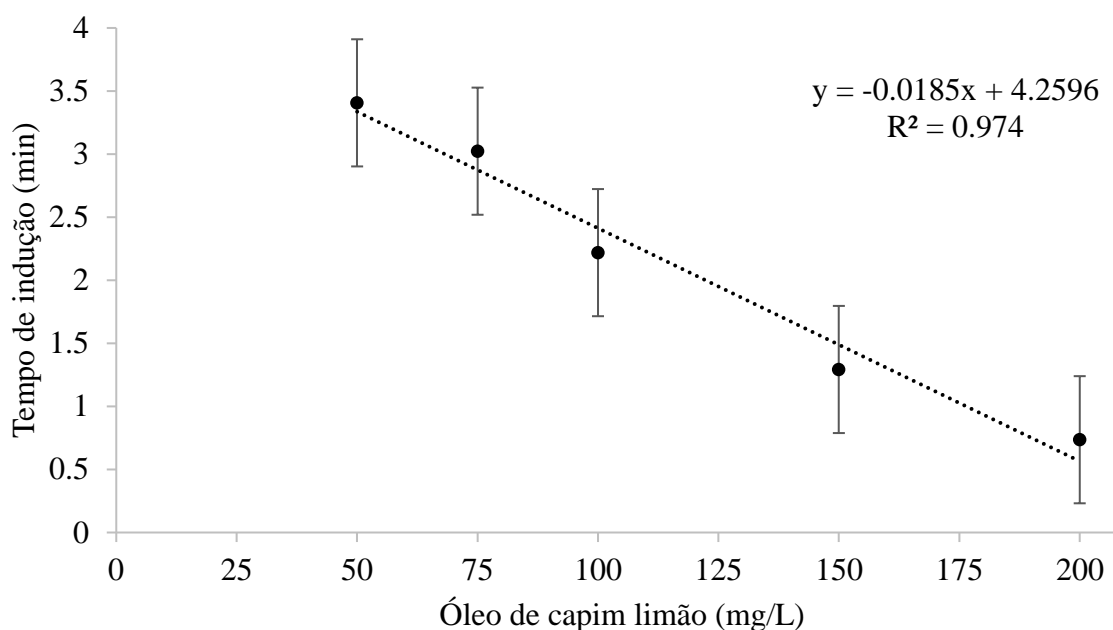


Figura 1. Tempo médio de indução à anestesia de *G. ternetzi* submetidos a diferentes concentrações de óleo de capim limão.

Houve efeito linear decrescente ( $p < 0,05$ ) do óleo de capim limão para a glicose sanguínea (Tabela 3, Figura 2).

Tabela 3. Valores médios de glicose sanguínea de tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi* submetidos à anestesia em diferentes concentrações do óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*.

	Óleo de capim limão (mg/L)							CV(%)
	0	25	50	75	100	150	200	
Glicose sanguínea* (mg.d/L)	47,00	61,33	56,33	39,66	46,00	21,33	27,33	26,00

CV – Coeficiente de variação

\*  $Y = 57,192 - 0,169x$  ( $R^2 = 0,673$ )

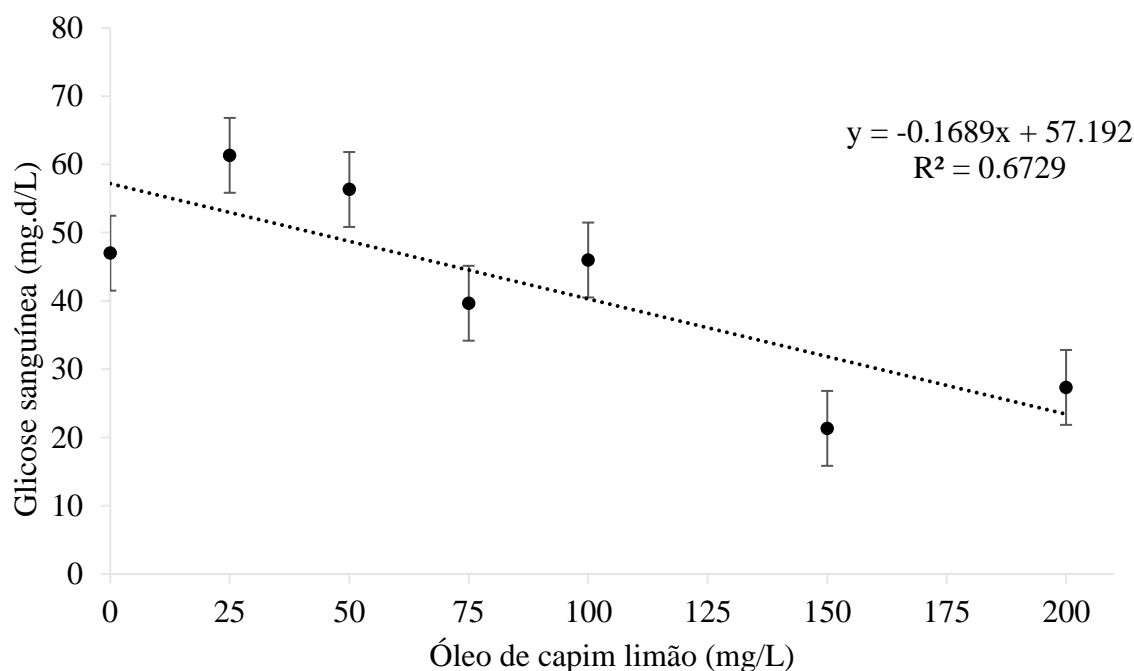


Figura 2. Valores médios de glicose sanguínea de *G. ternetzi* submetidos a anestesia com óleo de capim limão.

### Experimentos 2: Segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro durante exposição curta (5 minutos)

Nas concentrações de 0, 25, 50 e 75mg/L de óleo de capim limão não foi observada mortalidade dos peixes após 5 min. de anestesia. Entretanto, observou-se 20% de mortalidade na concentração de 100mg/L e 100% de mortalidade nas concentrações de 150 e 200mg/L (Tabela 4). Após 96h de observação não houve mortalidade dos peixes em nenhuma das concentrações de óleo de capim limão avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de taxa de mortalidade de *Gymnocorymbus ternetzi* submetidos à anestesia com diferentes concentrações de óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, durante a avaliação da segurança do óleo.

	Óleo de capim limão (mg/L)						
	0	25	50	75	100	150	200
Taxa de mortalidade 5 min (%)	0	0	0	0	20	100	100
Taxa de mortalidade 96h (%)	0	0	0	0	0	0	0

### Experimento 3. Segurança do óleo de capim limão como anestésico para tetra negro durante exposição prolongada (24h)

Em todas as concentrações de óleo de capim limão avaliadas, exceto na de 5mg/L, houve 100% de mortalidade após 24h (Tabela 5). Nas concentrações de 50, 60 e 70mg/L, todos os peixes morreram com cerca de 30 minutos. Nas concentrações de 20, 30 e 40mg/L, todos os peixes morreram com cerca de 120 minutos, e na concentração de 10mg/L os peixes começaram a morrer após 12h. Após 96h, todos os peixes sobreviveram na concentração de 5mg/L de óleo de capim limão (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios de taxa de mortalidade de *Gymnocorymbus ternetzi* submetidos à anestesia com diferentes concentrações de óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus*, durante a avaliação da segurança do óleo.

	Óleo de capim limão (mg/L)								
	0	5	10	20	30	40	50	60	70
Taxa de mortalidade 24h (%)	0	0	100	100	100	100	100	100	100
Taxa de mortalidade 96h (%)	0	0	-	-	-	-	-	-	-

## DISCUSSÃO

A ausência de comportamentos característicos de anestesia nos peixes submetidos ao controle positivo (álcool etílico absoluto – 3600mg/L) indica que esse não apresenta propriedades anestésicas, quando usado em baixas concentrações, como observado por (Egan et al., 2009). Este resultado confirma que os efeitos observados nas diferentes concentrações avaliadas podem ser atribuídos ao óleo de capim limão.

O óleo de capim limão é eficaz como anestésico para *G. ternetzi*, pois promoveu os comportamentos característicos de anestesia profunda em tempo menor que 3 minutos e tempo de recuperação menor que 5 minutos, como recomendado por Marking & Meyer (1985). O tempo de indução à anestesia pelo óleo de capim limão foi dose dependente, com a menor concentração estimada que promove anestesia profunda, com tempo menor que 3 minutos, de 68,08mg/L. A ausência de efeito do óleo de capim limão sobre o tempo de recuperação está de acordo com os resultados observados por Limma-Netto, Sena, & Copatti (2016) utilizando *Cymbopogon flexuosus* para anestesia de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*). Entretanto, o uso de citronela, *Cymbopogon nardus* (planta cujo óleo essencial tambapresenta como principal componente o citral), como anestésico para *Colossoma macropomum* mostrou aumento no tempo de recuperação (Barbas et al., 2017).

Os procedimentos relacionados com a anestesia dos peixes como captura, exposição ao ar, mudanças de qualidade de água, além dos manejos relacionados com biometria realizados no presente estudo causam estresse nos peixes como observado por Barbosa et al., (2010); Fernandes Junior et al. (2010); e Yarahmadi et al. (2016). O aumento de cortisol durante as respostas de estresse causa elevação dos níveis de glicose, lactato, ácidos graxos, colesterol e aminoácidos no plasma, além da redução das reservas de glicogênio no fígado, proteólise e inibição da síntese proteica muscular, distúrbios osmóticos e iônicos, mudanças hematológicas em eritrócitos e leucócitos, alterações no fluxo sanguíneo e na capacidade de transporte de oxigênio no sangue (Barbosa et al., 2010; Rodrigo E. Barreto & Volpato, 2011; Rodrigo Egidio Barreto & Volpato, 2004, 2006; Carvalho & Fernandes, 2006; Fernandes Junior et al., 2010; Ferreira & Matsubara, 1997; Mariano et al., 2009; Oba et al., 2009; Vargas-Chacoff et al., 2014; Yarahmadi et al., 2016). A exposição prolongada a fatores estressores causa redução no crescimento, na reprodução, imunodepressão, aumento à susceptibilidade a patógenos e, conseqüentemente, perdas por mortalidade e redução da

sustentabilidade econômica da criação de peixes de corte e ornamentais (Rodrigo E. Barreto & Volpato, 2011; Pickering & Pottinger, 1989; Yarahmadi et al., 2016). Dentre esses efeitos, a elevação da glicose sanguínea é considerada um bom indicador das respostas de estresse (Silbergeld, 1974). Portanto, a redução da glicemia em *G. ternetzi* indica que o óleo de capim limão é eficaz na redução das respostas de estresse durante os procedimentos de anestesia e biometria. Porém, o efeito hipoglicemiante do óleo de capim limão tem sido observado em animais não expostos a fatores estressores (Adeneye & Agbaje, 2007). Os referidos autores especulam que esse efeito pode ser decorrente da estimulação da secreção de insulina ou aumento da utilização da glicose pelos tecidos periféricos.

São características desejáveis de um anestésico promover anestesia em tempo menor que 3 minutos em baixas concentrações, recuperação em tempo menor que 5 minutos e reduzir respostas de estresse (Javahery, Nekoubin, & Moradlu, 2012; Matthews & Varga, 2012; Zahl, Samuelson, & Kiessling, 2012). Em função do óleo de capim limão apresentar tais características recomendamos sua utilização como anestésico para *G. ternetzi* na concentração de 68,0 mg/L.

Durante exposição curta (5 min.), o óleo de capim limão é seguro para *G. ternetzi* em concentrações de até 75mg/L, pois promoveu os comportamentos característicos da anestesia profunda sem causar a morte dos peixes, sendo então, seguro para procedimentos de manejo. Em concentrações iguais ou acima de 100mg/L o óleo de capim limão não é seguro como anestésico para *G. ternetzi*. O citral, principal princípio ativo do capim limão mostrou efeitos tóxicos em fêmeas de ratos (Gaworski, Vollmuth, York, Heck, & Aranyi, 1992) e pele humana (Hayes & Markovic, 2003). Gaworski et al 1992 observaram que 68 ppm de citral, administrado por inalação do vapor, causou dificuldade de respirar, opacidade ocular, secreção nasal, salivação e redução do ganho de peso. Na pele humana, o citral causou perda da integridade e solubilização do estrato córneo, necrose e vacuolização celular (Hayes and Markovic 2003). Considerando os danos causados a um tecido queratinizado como a pele, nas brânquias o citral deve apresentar efeitos mais danosos em função da sensibilidade desse órgão ser maior e assim causar mortalidade dos peixes.

Durante exposição prolongada (24h), o óleo de capim limão foi considerado seguro apenas na concentração de 5mg/L, pois nas concentrações iguais ou superiores a 10mg/L, o óleo de capim limão causou a morte de todos os peixes. A causa da mortalidade dos peixes provavelmente foi a depressão cardiorrespiratória, como observada por Barbas et al. (2017) em tambaqui *Collossoma macropomum*. Apesar de não ter sido observada mortalidade dos

peixes, os referidos autores relatam que a depressão cardiorrespiratória é reversível e dependente da dose e do tempo de exposição. Assim, o maior tempo de exposição (24h) do tetra negro ao óleo de capim limão explica a mortalidade dos peixes mesmo em baixas concentrações.

Durante exposição prolongada (24h), o óleo de capim limão foi considerado seguro apenas na concentração de 5mg/L. Porém, para que o capim limão possa ser usado como sedativo em transporte de peixes, é necessário a realização de experimentos para avaliar concentrações menores que 10mg/L. Os efeitos desejados de um sedativo no transporte de peixes são a redução das respostas de estresse, do metabolismo, do consumo de O<sub>2</sub>, da excreção de amônia, distúrbios osmóticos e hematológicos (Altun & Danabas, 2006; Bowker, Trushenski, Glover, Carty, & Wandeleir, 2015; Inoue, Santos Neto, & Moraes, 2003b; Oliveira et al., 2009; Pramod et al., 2010). Assim, a utilização de sedativos durante o transporte de peixes pode contribuir para a manutenção da qualidade de água, o que permite sua realização em maiores densidades de estocagem e/ou maior duração, com redução dos custos de transporte.

Devido à letalidade, associada a capacidade anestésica e redutora das respostas de estresse, o óleo de capim limão pode ser utilizado para eutanásia de peixes na concentração de 150 mg/L.

## CONCLUSÕES

O óleo de capim limão é eficaz como anestésico para *Gymnocorymbus ternetzi*. Durante exposição por até 5 min é seguro em concentrações menores ou iguais a 75mg/L. Sob exposição prologada é seguro em concentrações de até 5mg/L. Concentrações a partir de 150mg/L podem ser utilizadas para eutanásia de peixes.

## REFERÊNCIAS

- Adeneye, A. A., & Agbaje, E. O. (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *112*(3), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.034>
- Altun, T., & Danabas, D. (2006). Effects of short and long exposure to the anesthetic 2-Phenoxyethanol mixed with Ethyl Alcohol on Common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) Fingerlings, *58*(3), 178–182.
- Barbas, L. A. L., Hamoy, M., de Mello, V. J., Barbosa, R. P. M., de Lima, H. S. T., Torres, M. F., ... 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*(December 2016), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, *23*(4), 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2004). Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, *66*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.01.001>
- Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2006). Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. *Journal of Experimental Animal Science*, *43*(3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jeas.2006.05.001>
- Barreto, R. E., & Volpato, G. L. (2011). Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia. *Journal of Biosciences*, *36*(5), 851–855. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9111-4>
- Blanco, M. M., Costa, C. A. R. A., Freire, A. O., Santos, J. G., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, *16*(2–3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.04.007>
- Bowker, J. D., Trushenski, J. T., Glover, D. C., Carty, D. G., & Wandelaar, N. (2015). Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *25*(1), 147–163. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9374-6>
- Carbajal, D., Casaco, A., Arruzazabala, L., Gonzalez, R., & Tolon, Z. (1989). Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, *25*, 103–107.
- Carneiro, P. C. F., & Urbinati, E. C. (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*, *32*(4), 297–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00558.x>
- Carvalho, C. S., & Fernandes, M. N. (2006). Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH.

- Aquaculture*, 251, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.018>
- Crosby, T. C., Hill, J. E., Watson, C. A., Yanong, R. P. E., & Strange, R. (2006). Effects of tricaine methanesulfonate, hypno, metomidate, quinaldine, and salt on plasma cortisol levels following acute stress in threespot gourami *Trichogaster trichopterus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(1), 58–63. <https://doi.org/10.1577/H05-026.1>
- DEVI, R. C., Mui SIM, S., & Ismail, R. (2011). Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum \*. *J. Smooth Muscle Res*, 47(5), 143–156. <https://doi.org/10.1540/jsmr.47.143>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., ... Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Fabiani, B. M., Boscolo, W. R., Feiden, A., Diemer, O., Bittencourt, F., & Neu, D. H. (2013). Benzocaine and eugenol as anesthetics for *Brucon hilarii*. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 35(2), 113–117. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v35i2.16644>
- Fernandes Junior, A. C., Pezzato, L. E., Guimarães, I. G., Teixeira, C. P., Koch, J. F. A., & Barros, M. M. (2010). Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(8), 1619–1625. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800001>
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43(1), 61–68. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>
- Gaworski, C. L., Vollmuth, T. A., York, R. G., Heck, J. D., & Aranyi, C. (1992). Developmental toxicity evaluation of inhaled citral in Sprague-Dawley rats. *Fd Chem. Toxic.*, 30(4), 269–275.
- Gayathri, K., Jayachandran, K. S., Vasanthi, H. R., & Rajamanickam, G. V. (2010). Cardioprotective effect of lemon grass as evidenced by biochemical and histopathological changes in experimentally induced cardiotoxicity. *Human and Experimental Toxicology*, 30(8), 1073–1082. <https://doi.org/10.1177/0960327110386391>
- Hayes, A. J., & Markovic, B. (2003). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1409–1416. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00159-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00159-5)
- Hill, J. V., Davison, W., & Forster, M. E. (2002). The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heart ventricle, the cardiac vagus and branchial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1–2), 19–28. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000021742.30567.2d>
- Hovda, J., & Linley, T. J. (2000). The potential application of hypothermia for anesthesia in adult Pacific salmon. *North American Journal of Aquaculture*, 62(February 2013), 67–72.

[https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0067:TPAOHF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0067:TPAOHF>2.0.CO;2)

- Inoue, L. A. K. A., Santos Neto, C. Dos, & Moraes, G. (2003a). Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33(5), 943–947. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>
- Inoue, L. A. K. A., Santos Neto, C. Dos, & Moraes, G. (2003b). Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33, 943–947. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>
- Iwama, G. K., McGeer, J. C., & Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z89-294>
- Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1545–1552. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>
- Kittilsen, S., Schjolden, J., Beitnes-Johansen, I., Shaw, J. C., Pottinger, T. G., Sørensen, C., ... Øverli. (2009). Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Hormones and Behavior*, 56(3), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.06.006>
- Limma-Netto, J. D. D., Sena, A. C. C., & Copatti, C. E. E. (2016). Essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* Female). *Boletim Do Instituto de Pesca*, 42(3), 727–733. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p727>
- Lorenzetti, B. B., Souza, G. E. P., Sarti, S. J., Santos Filho, D., & Ferreira, S. H. (1991). Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90187-I](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90187-I)
- Mariano, W. dos S., Oba, E. T., Santos, L. R. B., & Fernandes, M. N. (2009). Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerthrinus americanus*) to atmospheric air exposure. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, 10(1), 210–223.
- Marking, L. L., & Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10, 2–5.
- Matthews, M., & Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR Journal*, 53(2), 192–204.
- Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Falceto, M. V., Esteban, J., Josa, A., & Espinosa, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture*, 433, 491–495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.013>
- Oba, E. T., Mariano, W. D. S., & Santos, L. R. B. (2009). Eliane Tie Oba, Wagner dos Santos Mariano & Laila Romagueira Bichara dos Santos. *Embrapa Amapá*, 226–247. Retrieved from <http://www.cpfap.embrapa.br/aquicultura/download/capitulo8.pdf>

- Oliveira, J. R., Carmo, J. L., Oliveira, K. K. C., & Soares, M. do C. F. (2009). Cloreto de sódio , benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(7), 1163–1169.
- Oyoo-Okoth, E., Cherop, L., Ngugi, C. C., Chepkirui-Boit, V., Manguya-Lusega, D., Ani-Sabwa, J., & Charo-Karisa, H. (2011). Survival and physiological response of *Labeo victorinus* (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient. *Aquaculture*, 319(1–2), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.052>
- Pickering, A., & Pottinger, T. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*, 7(1–4), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF00004714>
- Pramod, P. K., Sajeevan, T. P., Ramachandran, A., Thampy, S., & Pai, S. S. (2010). Effects of Two Anesthetics on Water Quality during Simulated Transport of a Tropical Ornamental Fish, the Indian tiger barb *Puntius filamentosus*. *North American Journal of Aquaculture*, 72(4), 290–297. <https://doi.org/10.1577/a09-063.1>
- Ramírez-Duarte, W. F., Pineda-Quiroga, C., Martínez, N., & Eslava-Mocha, P. R. (2011). Use of sodium chloride and zeolite during shipment of *Ancistrus triradiatus* under high temperature. *Neotropical Ichthyology*, 9(4), 909–914. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252011005000036>
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., ... Carnevali, O. (2006). Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(2), 167–177. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-0009-2>
- Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S. E., & Balm, P. H. M. (2003). Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 223(1–4), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00157-1)
- Silbergeld, E. K. (1974). Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(1), 20–25. <https://doi.org/10.1007/BF01685023>
- Singh, R. K., Vartak, V. R., Balange, A. K., & Ghughuskar, M. M. (2004). Water quality management during transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture*, 235(1–4), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.011>
- Tacchi, L., Lowrey, L., Musharrafieh, R., Crossey, K., Larragoite, E. T., & Salinas, I. (2015). Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 435, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.027>
- Van Der Salm, A. L., Martínez, M., Flik, G., & Wendelaar Bonga, S. E. (2004). Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*,

- 241(1–4), 371–386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.038>
- Vargas-Chacoff, L., Martínez, D., Oyarzún, R., Nualart, D., Olavarria, V., Yáñez, A., ... Mancera, J. M. (2014). Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *40*(2), 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.024>
- Velíšek, J., & Svobodová, Z. (2004). Anaesthesia of Common Carp ( *Cyprinus carpio* L .) with 2-phenoxyethanol : Acute Toxicity and Effects on Biochemical Blood Profile. *Acta Veterinaria Brno*, *73*, 247–252.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., & Piačková, V. (2007). Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on haematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, *76*(3), 487–492. <https://doi.org/10.2754/avb200776030487>
- Viana, G. S. ., Vale, T. ., Pinho, R. S. ., & Matos, F. J. . (2000). Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *70*(3), 323–327. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00168-3)
- Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, *269*(1–4), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.035>
- Woody, C. A., Nelson, J., & Ramstad, K. (2002). Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: Field trials. *Journal of Fish Biology*, *60*(2), 340–347. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1842>
- Yanbo, W., & Zirong, X. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, *127*(3–4), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003>
- Yarahmadi, P., Miandare, H. K., Fayaz, S., & Caipang, C. M. A. (2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, *48*, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007>
- Zahl, I. H., Kiessling, A., Samuelsen, O. B., & Hansen, M. K. (2009). Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, *295*(1–2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.019>
- Zahl, I. H., Samuelsen, O., & Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: Implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, *38*(1), 201–218. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1>
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*(3), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>

## **ANEXO**

## Anexo 1 – Certificado de aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO  
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: [ceuap@ufv.br](mailto:ceuap@ufv.br) – site: [www.ceuap.ufv.br](http://www.ceuap.ufv.br)

Viçosa, 23 de Nov. de 2017

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Extratos vegetais como aditivos na água de transporte de tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi***", protocolo nº **055/2017**, sob a responsabilidade de **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **17 de Nov. de 2017**.

Finalidade: (  )Pesquisa (  )Ensino

Vigência do Projeto: de **23 de Nov. de 2017** a **31 de Jan. de 2018**

Espécie/linhagem: **Peixe (*Gymnocorymbus ternetzi*)** Nº de animais: **827**

Peso: **5 g** Idade: **3 meses** Sexo: **"——"** Origem: **Setor de Piscicultura/UFV - CPF/CNPJ: 25.944.455/0001-96**

### CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Vegetal extracts as additives in black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi*, transport water**", protocol nº **055/2017**, under the responsibility of **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Nov, 17th, 2017**.

Finality: (  )Research (  )Education

Duration of the Project: from **Nov, 23th, 2017** to **Jan, 31th, 2018**.

Species / strain: **Fish (*Gymnocorymbus ternetzi*)** Nº of animals: **827**

Weight: **5 g** Age: **3 months** Sex: **"——"** Source: **Setor de Piscicultura/UFV - CPF/CNPJ: 25.944.455/0001-96**

Luciana Navajas Rennó  
Coordenadora da CEUAP/UFV