

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO REDUTORES DA EXCREÇÃO DE AMÔNIA EM JUVENIS DE CYPRINUS
CARPIO COMO
ESTRATÉGIA PARA MANTER A QUALIDADE DE ÁGUA**

Pedro Segantini Tótola
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

PEDRO SEGANTINI TÓTOLA

**ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO REDUTORES DA EXCREÇÃO DE AMÔNIA EM JUVENIS DE CYPRINUS
CARPIO COMO
ESTRATÉGIA PARA MANTER A QUALIDADE DE ÁGUA**

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*.

Orientador: Jener A Sampaio Zuanon

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T717o
2024 Tótola, Pedro Segantini, 1997-
Óleos essenciais como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio* como estratégia para manter a qualidade de água / Pedro Segantini Tótola. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (60 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.547>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Carpa (Peixe). 2. Peixes ornamentais. 3. Amônia.
4. Essências e óleos essenciais. I. Zuanon, Jener Alexandre Sampaio, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 597.483


PEDRO SEGANTINI TÓTOLA

**ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO REDUTORES DA EXCREÇÃO DE AMÔNIA EM JUVENIS DE CYPRINUS
CARPIO COMO
ESTRATÉGIA PARA MANTER A QUALIDADE DE ÁGUA**


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: 30 de junho de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 PEDRO SEGANTINI TOTOLA
Data: 06/09/2024 11:30:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pedro Segantini Tótola
Autor

Documento assinado digitalmente
 JENER ALEXANDRE SAMPAIO ZUANON
Data: 06/09/2024 17:41:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jener Alexandre Sampaio Zuanon
Orientador

Este trabalho é dedicado à minha família, amigos e namorada. Sem vocês eu nada
seria.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por ser minha segunda casa desde a graduação, e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, pela oportunidade e suporte concedidos que tornaram este trabalho possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon, por ser um profissional exemplar, que trata seus alunos com seriedade e, acima de tudo, empatia.

Ao Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes, pela disponibilidade, auxílio e parceria durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Fernando de Oliveira, pela troca de conhecimento e experiências e pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação, por todo conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de equipe do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP), por todo o suporte durante a realização do projeto e, não menos importante, pelos momentos de descontração, risadas e experiências trocadas. Agradeço aos meus pais, Primo Sergio Tótola e Cassia Regina Segantini Teixeira, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, sempre apoiando e incentivando as minhas decisões.

A minha tia, Maria Eugênia Tótola, pelo apoio e confiança durante toda minha vida e por ser minha inspiração e exemplo sempre.

A minha amada avó, Terezinha Faustini Tótola, por ser sempre presente e me incentivar a buscar conhecimento de todas as formas, e por me inspirar e ser uma pessoa melhor.

Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, por sempre me proporcionarem momentos felizes e serem exemplos de trabalho e honestidade.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos melhores e piores momentos.

Ao meu amor, Nancy Miranda Sena, por ser meu porto seguro, incentivadora dos meus sonhos e objetivos, companheira, cuidadosa e atenciosa.

Muito obrigado a todos!

“Podemos julgar o coração de um homem pela forma como ele trata os animais.”
(Immanuel Kant)

RESUMO

TÓTOLA, Pedro Segantini, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2024. **Óleos essenciais como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio* como estratégia para manter a qualidade de água.** Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

A amônia é um dos principais fatores causadores de perdas, tanto em ambientes de cultivo, como durante o transporte de peixes, por causar danos em brânquias, fígado, rins e sistema nervoso, estresse oxidativo, alterações comportamentais, natação errática, convulsões e morte. Portanto, é necessária a busca por aditivos que reduzam a excreção de amônia e contribuam para a manutenção da qualidade da água. Deste modo, objetivamos avaliar a eficácia e segurança dos óleos de cravo, *Syzygium aromaticum*, orégano, *Origanum vulgare*, e melaleuca, *Melaleuca alternifolia* como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio*, uma importante espécie ornamental comercializada no mundo todo. Foram realizados três experimentos independentes, em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram avaliadas as concentrações 0; 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo; 0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mg/L de óleo de orégano, e 0; 8,75; 17,5; 26,75 e 35 mg/L de óleo de melaleuca. Os peixes foram mantidos durante 24h em aquários de vidro de 20 L dotados de aeração e temperatura controlada ($24,5 \pm 0,46$ °C), contendo 30 peixes/aquário nos experimentos com os óleos de orégano e melaleuca, e 20 peixes/aquário no experimento com óleo de cravo. Cada aquário foi considerado uma unidade experimental. Foram avaliadas as seguintes variáveis: amônia total (AT), amônia não ionizada (ANI), taxa de excreção de amônia (TAN), oxigênio dissolvido e pH da água, bem como a glicose sanguínea dos peixes. Todas as concentrações dos óleos avaliados causaram redução de AT, ANI e TAN, contudo, as concentrações mais baixas (3,75 mg/L de óleo de cravo; 1,25 de óleo de orégano e 8,75 de óleo de melaleuca) apresentaram melhor custo/benefício por serem tão eficazes na redução da excreção de amônia quanto as concentrações mais altas, e serem menos onerosas. As concentrações mais altas de todos os óleos avaliados (11,25 e 15,0 mg/L de óleo de cravo; 2,5; 3,75 e 5,0 mg/L de óleo de orégano e 26,25 e 35,0 mg/L de óleo de melaleuca) causaram estresse nos peixes (aumento da glicemia) e, portanto, não são consideradas seguras. Dessa forma, considerando a eficácia na redução de excreção de

amônia, a segurança e os custos do uso dos óleos, as concentrações recomendadas para juvenis de *C. carpio* são 3,75 mg/L de óleo de cravo; 1,25 de óleo de orégano e 8,75 de óleo de melaleuca.

Palavras-chave: nitrogênio amoniacal; extratos vegetais; peixes ornamentais; sedação;

ABSTRACT

TÓTOLA, Pedro Segantini, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2024. **Essential oils as reducers of ammonia excretion in juvenile *Cyprinus carpio* as a strategy to maintain water quality.** Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Ammonia is one of the main factors causing losses, both in culture environments and during fish transportation, as it causes damage to the gills, liver, kidneys, and nervous system, oxidative stress, behavioral changes, erratic swimming, convulsions, and death. Therefore, it is necessary to search for additives that reduce ammonia excretion and contribute to maintaining water quality. Thus, we aimed to evaluate the efficacy and safety of clove, *Syzygium aromaticum*, oregano, *Origanum vulgare*, and tea tree oils, *Melaleuca alternifolia* as reducers of ammonia excretion in juveniles of *Cyprinus carpio*, an important ornamental species commercialized worldwide. Three independent experiments were done in a completely randomized design with five treatments and four replicates. The following concentrations were evaluated: 0; 3.75; 7.5; 11.25 and 15 mg/L of clove oil; 0; 1.25; 2.5; 3.75 and 5 mg/L of oregano oil, and 0; 8.75; 17.5; 26.75 and 35 mg/L of tea tree oil. Fish were kept for 24 h in 20 L glass aquariums with aeration and controlled temperature (24.5 ± 0.46 °C), containing 30 fish/aquarium in the experiments with oregano and tea tree oils, and 20 fish/aquarium in the experiment with clove oil. Each aquarium was considered an experimental unit. The following variables were evaluated: total ammonia (TA), non-ionized ammonia (NIA), ammonia excretion rate (TAN), dissolved oxygen and water pH, as well as blood glucose of the fish. All concentrations of the oils evaluated caused a reduction of AT, ANI, and TAN, however, the lowest concentrations (3.75 mg/L of clove oil; 1.25 of oregano oil, and 8.75 of tea tree oil) presented better cost/benefit because they were as effective in reducing ammonia excretion as the higher concentrations, and were less expensive. The highest concentrations of all the oils evaluated (11.25 and 15.0 mg/L of clove oil; 2.5, 3.75, and 5.0 mg/L of oregano oil and 26.25 and 35.0 mg/L of tea tree oil) caused stress in the fish (increased blood glucose) and, therefore, are not considered safe. Thus, considering the effectiveness in reducing ammonia excretion, the safety, and the costs of using the oils, the recommended concentrations for juvenile *C. carpio* are 3.75 mg/L of clove oil; 1.25 mg/L of oregano oil and 8.75 mg/L of tea tree oil.

Keywords: ammoniacal nitrogen; plant extracts; ornamental fish; sedation;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mecanismos de excreção de amônia em peixes teleósteos (Evans et al., 2005) 17
- Figura 2. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. $p = 0,000062$. • $AT_0 = 0,036150 + 0,017592x$; $R^2 = 0,73$; $AT_{3,75} = 0,053750 + 0,011675x$; $R^2 = 0,74$; $AT_{7,5} = 0,013800 + 0,010717x$; $R^2 = 0,80$; $AT_{11,25} = 0,01685 + 0,01038x$; $R^2 = 0,82$; $\times AT_{15} = 0,0044500 + 0,0132375x$; $R^2 = 0,92$ 32
- Figura 3. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. $p = 0,000131$. • $ANI_0 = 0,000755 + 0,0004075x$; $R^2 = 0,72$; $ANI_{3,75} = 0,00107 + 0,0002158x$; $R^2 = 0,78$; $ANI_{7,5} = 0,00028 + 0,0001988x$; $R^2 = 0,73$; $ANI_{11,25} = 0,00033 + 0,0001883x$; $R^2 = 0,82$; $\times ANI_{15} = 0,0132375 + 0,0132375x$; $R^2 = 0,75$. 32
- Figura 4. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água, durante 24h. $AT = 0,492757 - 0,041584x + 0,002031x^2$ com $R^2 = 0,68$. $p = 0,00103$. Min = 10,24 mg/L óleo de cravo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade 33
- Figura 5. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água, durante 24h. $ANI = 0,01126 - 0,001184x + 0,00005321x^2$ com $R^2 = 0,75$. $p = 0,0000704$. Min = 11,13 mg/L óleo de cravo. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. 33
- Figura 6. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água durante 24h. $TAN = 0,00825 - 0,00076x$; platô = 3,77 mg/L; $R^2 = 0,55$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00521$ 34
- Figura 7. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0624$. 34
- Figura 8. Oxigênio dissolvido na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,261$. 35

Figura 9. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de cravo por 24h 35

Figura 10. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000721$. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. 35

Figura 11. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $p = 0,0000000623$. • $AT_0 = 0.052200 + 0.029042x$; $R^2 = 0,91$; $AT_{1,25} = 0.097850 + 0.015950x$; $R^2 = 0,66$; $AT_{2,5} = 0.062500 + 0.022204x$; $R^2 = 0,89$; $AT_{3,75} = 0.09355 + 0.01852x$; $R^2 = 0,87$; × $AT_5 = 0.129300 + 0.018650x$; $R^2 = 0,87$. 37

Figura 12. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $p = 0,00000222$. $AT_0 = -0,000496 + 0,0008032x$; $R^2 = 0,85$; $AT_{1,25} = 0,0007765 + 0,0003703x$; $R^2 = 0,70$; $AT_{2,5} = 0,000606 + 0,0004262x$; $R^2 = 0,88$; $AT_{3,75} = 0,001224 + 0,000346x$; $R^2 = 0,86$; × $AT_5 = 0,001739 + 0,0003335x$; $R^2 = 0,88$ 37

Figura 13. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água, durante 24h. $AT = 0,706471 - 0,117214x + 0,018551x^2$; $R^2 = 0,34$. $p = 0,00548$. Valor estimado que minimiza a $AT = 3,16$ mg/L óleo de orégano. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. 38

Figura 14. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água, durante 24h. $ANI = 0,01995 - 0,00734x$; platô = 1,32 mg/L de óleo de orégano; $R^2 = 0,76$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,000117$. 39

Figura 15. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água durante 24h. $TAN = 0,017225 - 0,001062x$; $R^2 = 0,23$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0138$. 39

Figura 16. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de cravo por 24h 40

Figura 17. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % 41

de probabilidade. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,000000112$.

Figura 18. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $\text{pH} = 7,687 - 0,0384x$; $R^2 = 0,69$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000541$

41

Figura 19. Oxigênio dissolvido (O_2) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $\text{O}_2 = 4,11643 - 0,41229x + 0,06286x^2$; $R^2 = 0,61$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00229$.

42

Figura 20. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. $p = 0,0000393$. • $\text{AT}_0 = 0,105260 + 0,044542x$; $R^2 = 0,94$; $\text{AT}_{8,75} = 0,114625 + 0,009412x$; $R^2 = 0,47$; $\text{AT}_{17,5} = 0,084485 + 0,012455x$; $R^2 = 0,50$; $\text{AT}_{26,25} = 0,152115 + 0,004910x$; $R^2 = 0,30$; × $\text{AT}_{35} = 0,126570 + 0,008941x$; $R^2 = 0,71$.

43

Figura 21. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. • $\text{AT}_0 = 0,001828 + 0,0008671x$; $R^2 = 0,84$. $p = 0,00000246$

44

Figura 22. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água, durante 24h. $\text{AT} = 1,0554986 - 0,0694148x + 0,0014802x^2$; $R^2 = 0,77$. Valor estimado que minimiza a AT = 23,45 mg/L óleo de melaleuca. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00000136$.

44

Figura 23. NH_3 da água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água durante 24h. $\text{NH}_3 = 0,023575 - 0,0022771x$; platô = 8,82 mg/L; $R^2 = 0,84$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000046$

45

Figura 24. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água durante 24h. $\text{TAN} = 0,035025 - 0,0029771x$; platô = 8,98 mg/L; $R^2 = 0,86$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00000143$

46

Figura 25. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de melaleuca por 24h

46

Figura 26. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00003$. 47

Figura 27. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. $pH = 7.4645 - 0,014771x$; $R^2 = 0,48$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0107$ 48

Figura 28. Oxigênio dissolvido (O_2) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0549$. 48

Figura 29. Efeito do óleo de cravo na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle, sem óleos essenciais 49

Figura 30. Efeito do óleo de orégano na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle, sem óleos essenciais 49

Figura 31. Efeito do óleo de melaleuca na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle sem óleos essenciais 50

SUMÁRIO

RESUMO	6
INTRODUÇÃO GERAL	14
RESUMO	26
1. Introdução	27
2. Material e Métodos	29
2.1. Qualidade de água	30
2.2. Segurança do uso de óleos essenciais	30
2.3. Análise estatística	30
3. Resultados	31
3.1. Óleo essencial de cravo	31
3.2. Óleo essencial de orégano	36
3.3. Óleo de melaleuca	42
4. Discussão	50
5. Referências bibliográficas	55
ANEXO I: Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção (CEUAP)	61

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

O setor de peixes ornamentais se destaca como um dos seguimentos mais importantes da aquicultura mundial em função do grande número de países envolvidos na produção e comercialização, e grande diversidade de espécies que sustentam o aquarismo. A exportação mundial de peixes ornamentais de água doce atingiu cerca de 251,4 milhões de dólares em 2022, tendo como líder o Japão (US\$ 48,6 milhões), seguido de Singapura (US\$ 35 milhões) e Indonésia (US\$ 29,5 milhões). No mesmo ano, o Brasil ocupou a 10^o posição no ranking mundial, com exportações que alcançaram cerca de US\$ 6,65 milhões (International Trade Center, 2022). No Brasil, a produção está concentrada em centros produtivos, sendo a microrregião de Muriaé na Zona da Mata Mineira o principal polo produtor (Pezzato & Scorvo Filho, 2000). A população de peixes ornamentais no país somou 21,3 milhões de espécimes em 2021 e 22,2 milhões em 2022, com crescimento acumulado de 4% neste período, demonstrando o potencial do mercado em crescimento significativo mesmo em tempos de pandemia (ABINPET, 2023). A indústria de peixes ornamentais inclui mais de 120 países produtores, importadores e exportadores que engloba a comercialização de acessórios como: aquários, sistemas de filtragem, aquecedores, rações e plantas aquáticas (Rezende & Fujimoto, 2021).

Durante a comercialização de peixes vivos, o transporte é uma atividade essencial para atender as demandas do mercado tanto de juvenis e reprodutores de peixes de corte como peixes ornamentais. Porém, o transporte e os manejos associados como captura, classificação, adensamento, confinamento e alterações da qualidade da água, frequentemente desencadeiam respostas de estresse nos peixes (Carneiro & Urbinatti, 2002; Gomes et al., 2003; Portz et al., 2006; Harmon, 2009; Vanderzwalmen et al., 2019;). Esses fatores podem alterar a qualidade do produto final, especialmente de peixes ornamentais, com alterações de características morfológicas importantes como coloração, integridade de escamas e nadadeiras, além de alterações no estado fisiológico do animal, o que influencia sua capacidade de adaptação a um novo ambiente, reduzindo a taxa de sobrevivência (Inoue; Neto; Moraes, 2004; Abele et al., 2011). Os peixes podem ser transportados em sistemas abertos ou fechados utilizando diferentes tecnologias e insumos. Sistemas abertos consistem em tanques dotados de oxigenação contínua em caminhões para deslocamento em terra, enquanto sistemas fechados utilizam de duas camadas de sacos plásticos, seladas, preenchidas com água e infladas com oxigênio, utilizado tanto em transporte aéreo, como terrestre. Em geral, em transportes de longa duração utiliza-se o sistema fechado (Lim et al. 2003; Pramod et al. 2010).

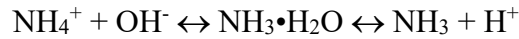
Sampaio & Freire (2016) classificam o transporte de curta duração aquele realizado em tempo menor que oito horas e de longa duração, em tempo maior que oito horas. Nos transportes de curta duração, o principal problema enfrentado pelos peixes é a redução do pH da água, que ocorre em função da excreção de íons H^+ pelas brânquias e sua formação pelo aumento da excreção de gás carbônico (CO_2). O gás carbônico reage com água (H_2O) produzindo ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia nos íons bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogênio (H^+), como mostra a reação reversível (Randall et al., 2002):



Esta reação ocorre tanto no meio interno (fluido intersticial e plasma) como no meio externo. O aumento na concentração de HCO_3^- não causa alterações significativas no meio interno, pois o plasma, em condições basais, apresenta altas concentrações desse íon. A elevação da concentração de H^+ no meio interno pode causar diminuição do pH plasmático e da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Baldisserotto, 2002), o que pode dificultar a captação de oxigênio da água. Apesar dos peixes apresentarem capacidade de excretar o excesso de íons H^+ pelas brânquias, caso o pH da água atinja valores críticos, a excreção desses íons e a capacidade de manutenção do equilíbrio ácido-base pode ficar comprometida, e causar perdas por mortalidade. O aumento da excreção de CO_2 , e conseqüente a redução do pH da água, é frequentemente causado pelo aumento do metabolismo como parte das respostas de estresse, que também eleva a demanda por oxigênio. O aumento na ventilação branquial em resposta ao aumento da necessidade de oxigênio ocasiona dificuldade de manutenção do equilíbrio iônico e osmótico, uma vez que, em peixes de água doce, durante a ventilação branquial, observamos uma tendência para perda de sais e acúmulo de água no meio interno (Baldisserotto & Becker, 2014). Sob estas condições, há maior demanda de energia relacionada aos processos de restabelecimento da homeostase iônica e osmótica (Baldisserotto, 2002).

No transporte de longa duração, o principal problema enfrentado pelos peixes é o acúmulo de amônia não ionizada (NH_3) na água (Sampaio & Freire, 2016) proveniente do metabolismo de aminoácidos pelos peixes (Lim et al., 2001), sob a influência de fatores como alimentação/nutrição, temperatura da água e a condição fisiológica do animal (Ip et al., 2001; Lim et al., 2004) como a presença de fatores estressores (Randall & Tsui, 2002). Em meio aquoso, a amônia se encontra em duas formas: não-ionizada (NH_3) e ionizada (NH_4^+), onde a primeira é a forma livremente difusível pelas brânquias dos peixes, e por isso, considerada mais tóxica (Evans et al., 2005; Randall, 2011, Ying et al. 2018). A amônia total é representada pelo

somatório de ambas as formas ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), que se encontram em equilíbrio como demonstrado pela equação (Ying et al., 2018):



O aumento no pH do meio desloca o equilíbrio da reação para a formação de NH_3 , enquanto a redução no pH eleva a concentração de NH_4^+ . Portanto, em pHs mais elevados a amônia se torna mais tóxica para os peixes por ser a forma livremente difusível entre sangue e água (Randall & Tsui, 2002). A temperatura e a salinidade da água também influenciam as proporções entre NH_3 e NH_4^+ , porém, com efeitos menos pronunciados que do pH (Usepa, 1998; Randall & Tsui, 2002).

Em condições de transporte, os peixes são previamente submetidos a jejum para redução da quantidade de matéria orgânica na água proveniente das fezes e reduzir o substrato disponível para a população de bactérias heterotróficas presentes no meio. Esse procedimento pode causar dois efeitos: reduzir a formação de amônia por parte dessas bactérias; e aumentar a exceção de amônia pelos peixes devido a degradação de proteínas e aminoácidos no processo de manutenção da homeostase glicêmica (Lim et al., 2001). Com o esgotamento das reservas de glicogênio hepático, os animais ativam o processo de gliconeogênese no fígado, com liberação de glicose no sangue, que permite manter a glicemia. Para que os esqueletos de carbono dos aminoácidos sejam utilizados como substrato da gliconeogênese, são necessários os processos de transaminação e desaminação de aminoácidos, com conseqüente aumento da concentração de amônia no meio interno (Nelson, 2021). O acúmulo de amônia na água de transporte causa redução do gradiente de concentração de NH_3 entre sangue e água, o que dificulta a continuidade de sua excreção (Xu et al., 2021). Apesar dos peixes apresentarem outros mecanismos de excreção de amônia, como a difusão de NH_3 dependente da secreção de prótons e o contra transporte de NH_4^+ com o Na^+ (Fig. 1), a elevação dos níveis de NH_3 no sangue causa diversos efeitos tóxicos aos peixes (Evans et al., 2005).

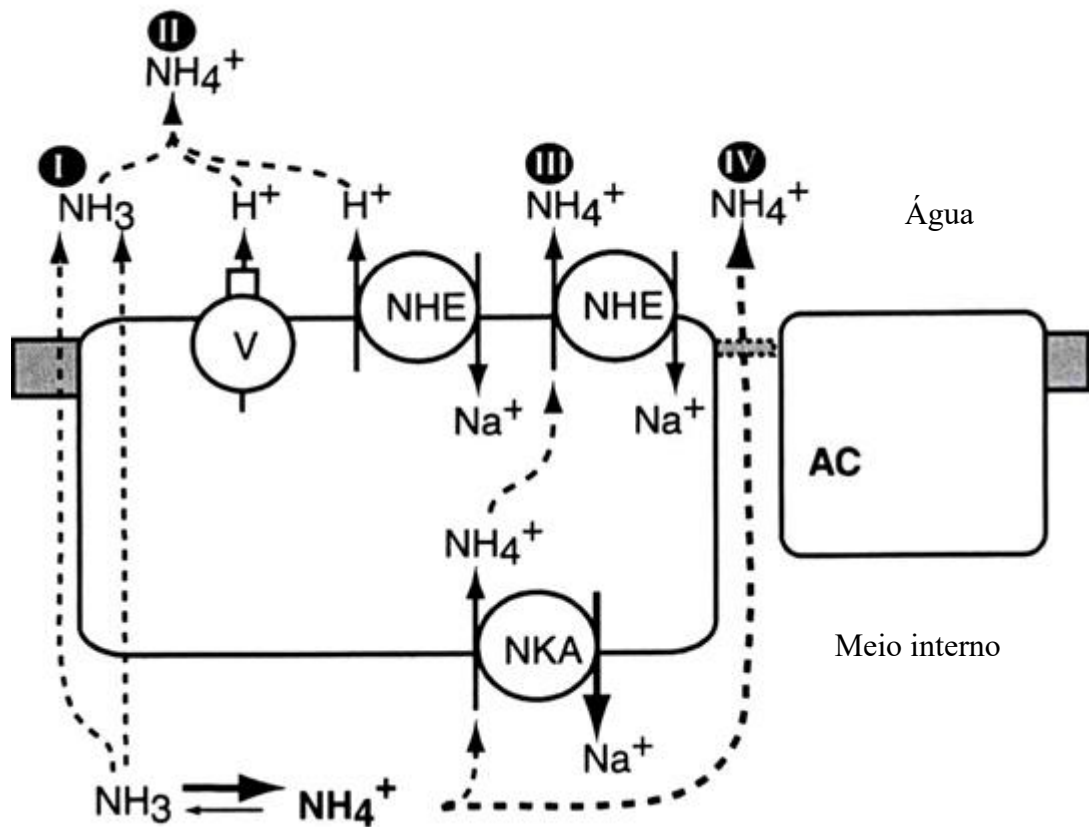


Figura 0-1: Mecanismos de excreção de amônia através das brânquias de peixes teleósteos. AC – célula acessória; NHE – contra transportador; NKA – Na^+/K^+ ATPase; V – bomba de prótons; I – difusão de NH_3 pelas vias transcelular e paracelular; II – difusão de NH_3 dependente de excreção de prótons; III – Transporte de NH_4^+ através do contra transportador NHE e da Na^+/K^+ ATPase; IV – Difusão de NH_4^+ através de junções frouxas entre célula rica em mitocôndria e célula acessória (apenas em teleósteos marinhos). Adaptado de Evans et al., 2005.

A elevação do teor de amônia no meio interno causa danos às brânquias, dificuldade para captação e transporte de oxigênio, hiperventilação, aumento no pH plasmático, redução na taxa metabólica, redução da capacidade imunológica, estresse oxidativo, danos no fígado, rins e sistema nervoso, convulsões e morte por exaustão (Twitchen & Eddy, 1994; Xu et al., 2021). Recentemente, os mecanismos tóxicos da amônia sobre o sistema nervoso têm sido elucidados (Ip & Chew, 2010; Xu et al., 2021). A amônia desencadeia a liberação de glutamato pelos astrócitos por meio da indução da exocitose das vesículas contendo o neurotransmissor. A liberação excessiva de glutamato causa ativação de receptores NMDA nos neurônios, o que desencadeia a ativação de várias vias de sinalização intracelular mediadas pelo cálcio. Dentre os efeitos da ativação dessas vias, destacam-se o estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e morte celular (Roman & González, 2024). Esse processo patológico, no qual células nervosas

são danificadas ou mortas por estimulação excessiva por neurotransmissores, é conhecido como excitotoxicidade (Beal, 1992).

Os peixes, assim como outros vertebrados apresentam mecanismos naturais que os protegem da intoxicação do sistema nervoso central pela amônia, como a enzima glutamina sintetase (GS) que, nos astrócitos, converte o glutamato liberado pelos neurônios em glutamina, e assim, reduzindo os níveis de amônia no meio interno (Ip & Chew, 2010). Contudo, a síntese excessiva de glutamina pode levar ao inchaço de astrócitos e edema cerebral (Wee et al., 2007; Görg et al., 2010). Além disso, o NH_4^+ causa despolarização da membrana de neurônios por competir pelos íons K^+ nos canais de K^+ voltagem dependentes (Randall & Tsui, 2002). A estimulação excessiva de neurônios por meio de despolarizações desordenadas pode causar perda de equilíbrio, natação errática, convulsões e morte dos peixes (Ip et al., 2001).

Dentre as alternativas para evitar o aumento na concentração de amônia na água de transporte de peixes, destacam-se os aditivos como probióticos (Gomes et al., 2008), sal comum (Martins et al., 2024) e sedativos sintéticos e naturais (Hoseini, Mirghaed, & Yousefi, 2019). Os sedativos sintéticos mais utilizados na aquacultura são benzocaina, MS-222, metomidato, sulfato de quinaldina e fenoxietanol (Martins et al., 2019). Porém, esses podem desencadear respostas de estresse em peixes por apresentarem alta irritabilidade, sendo aversivos mesmo quando utilizados em baixas concentrações (Thomas & Robertson, 1991; Tort et al., 2002; Wagner et al., 2002; Bolasina, 2006; Sladky, 2001). Os óleos essenciais (OE) com propriedades sedativas vêm sendo utilizados como redutores do metabolismo, das respostas de estresse e mantenedores da qualidade de água (Vanderzwalmen et al., 2019). Esses produtos ainda apresentam outras propriedades benéficas aos peixes como atividade antioxidante, antimicrobiana e imunoestimulante (Saccol et al., 2017; Costa, 2002; Da Cunha et al., 2010; Fujimoto et al., 2018). Diversos estudos têm demonstrado os benefícios do uso de óleos essenciais durante o transporte de peixes de corte e ornamentais (Vanderzwalmen et al., 2019; Aydın & Barbas, 2020), contudo, poucos avaliaram suas limitações de uso e possíveis efeitos colaterais.

Os sedativos sintéticos, apesar de sua eficácia na sedação de peixes, podem não ser seguros para uso durante o transporte devido a efeitos deletérios como hiperatividade, secreção excessiva de muco, irritação em brânquias e danos em córneas (Mirghaed, Ghelichpour & Hoseini, 2016; Cunha et al., 2017; Teixeira et al., 2017). Dentre os sedativos naturais, como os óleos essenciais, com potencial para a redução da excreção de amônia, destaca-se o cravo-da-índia, *Sysigium aromaticum*, o principal anestésico natural para peixes, amplamente utilizado devido suas propriedades antimicrobiana, antioxidante, miorelaxante e imuno estimulante (Hajek, Klyszejko & Dziaman, 2006; Fujimoto et al., 2018; Abdelkhalek et al., 2020), além de

ser de baixo custo e de fácil obtenção (Mitjana et al., 2014). Contudo, apesar de muitos autores considerarem o óleo de cravo seguro para peixes, ele pode aumentar respostas de estresse (King et al., 2005), causar danos em brânquias, distúrbios osmorregulatórios, estresse oxidativo (Afifi et al., 2000; Sink & Neal, 2009; Velisek et al., 2011; Martins et al., 2024) e efeitos genotóxicos (Bona et al., 2024). Portanto, é necessário avaliar outros óleos essenciais com propriedades semelhantes que sejam eficazes na redução da excreção de amônia, seguros para os peixes, de baixo custo e de fácil obtenção. Becker et al. (2016) observaram que o óleo de *Lippia alba* reduziu o teor de amônia total na água de transporte de *Rhamdia quelen*, contudo o mesmo também causou aumento nos níveis de cortisol plasmático e na pressão parcial de CO₂ e reduziu as reservas de glicogênio hepático e muscular. Brandão et al. (2022) observaram que o óleo de *Mentha piperita* reduziu a excreção de amônia durante o transporte de *Colossoma macropomum*, contudo Spanghero et al. (2019) observaram que o óleo de *M. piperita* causou lesões em brânquias em *Rhamdia quelen*. Fang et al. (2024) observaram que os óleos de *Ocimum basilicum* e *Zingiber officinale* reduziram o teor de amônia na água, bem como as respostas de estresse e estresse oxidativo no híbrido *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, submetido ao transporte. Contudo, os referidos autores também observaram aumento nas enzimas lactato desidrogenase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, o que pode indicar lesões em órgãos. Os óleos de melaleuca, *Melaleuca alternifolia*, e de orégano, *Origanum vulgare*, além de suas propriedades sedativa/anestésica, antimicrobiana, antioxidante, imunoestimulante, analgésica e antiinflamatória (Borotová et al., 2022; Nova et al., 2024; Moghrovyan et al., 2022; Drăgan et al., 2022) apresentam boa disponibilidade no mercado. Além disso, o óleo de melaleuca não apresenta efeito genotóxico (Bona et al., 2024) e o óleo de orégano apresenta menor tempo de indução a anestesia (Gabriel et al., 2022) e menor efeito estressor quando comparado ao óleo de cravo (Bodur et al., 2018b). Portanto, são necessários estudos para avaliar a eficácia do uso de óleos essenciais como redutores da excreção de amônia durante o transporte de peixes, que sejam seguros do ponto de vista do bem estar animal.

Referências Bibliográficas

Abele D., Vazquez-Medina J. P., Zenteno-Savin T. (2011) Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. John Wiley & Son, 548 p.

Abinpet – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. (2023). Mercado Pet Brasil 2023. São Paulo/SP. Disponível em <<https://abinpet.org.br/dados-de-mercado/>>

Aydın, B., & Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>

Baldisseroto, B. (2002). Fisiologia de peixe aplicada a piscicultura, 211p. Santa Maria, SC, Brazil.

Baldisseroto, B., Becker, G. A. (2014) *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP; UNESP. (253-264) 336p.

Beal, M. F. (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. The FASEB journal, 6(15), 3338-3344. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.15.1464368>

Becker, A. G., Parodi, T. V., Zeppenfeld, C. C., Salbego, J., Cunha, M. A., Heldwein, C. G., Loro, V. L., Heinzmann B. M., & 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. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0118-x>

Bolasina, S. N. (2006). Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquacult. Int.* 14, 569–575. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9055-0>

Brandão, F. R., Duncan, W. P., Farias, C. F. S., de Melo Souza, D. C., de Oliveira, M. I. B., Rocha, M. J. S., ... & Chagas, E. C. (2022). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* as reducers of stress during the transport of *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 560, 738515. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738515>

Carneiro, P. C. F. & Urbinati, E. C. (2002) Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International* 10, 221–229. <https://doi.org/10.1023/A:1022166411089>

Costa, S. M. O., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D. L., Assunção, J. C. C., & Braz-Filho, R. (2002). Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 66-67. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300032>

Da Cunha, M. A., DE Barros, F. M. C., De Oliveira Garcia, L., De Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T. & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1-4), 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>

Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>

Fang, D., Zhang, C., Mei, J., Qiu, W., & Xie, J. (2024). Effects of *Ocimum basilicum* essential oil and ginger extract on serum biochemistry, oxidative stress and gill tissue damage of pearl gentian grouper during simulated live transport. *Veterinary Research Communications*, 48(1), 139-152. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10197-9>

Fujimoto, R. Y., Pereira, D. M., Silva, J. C. S., De Oliveira, L. C. A., Inoue, L. A. K. A., Hamoy, M., De Mello, V. J., Torres, M. F. & Barbas, L. A. L. (2018). Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish physiology and biochemistry*, 44(1), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>

Gomes L. C., Brinn R. P., Marcon J.L., Dantas L. A., Brandão F. R., Sampaio de Abreu J. et al. (2008). Using Efinol® L during transportation of marbled hatchetfish, *Carnegiella strigata* (Günther). *Aquaculture Research*. 39: 1292–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01993.x>

Gomes, L. D., Araujo-lima, C. A., Roubach, R. & Urbinati, E. C. (2003). Assessment on the effect of salt and density on tambaqui fish transportation. *Pesqui Agropecu Bras*, 38(2), 283-290. Doi: 10.1590/S0100-204X2003000200016

Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Rev Aquac*, 1(1), 58-66. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>

Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A. & Yousefi, M. (2019). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Rev Aquac*, 11(3), 550-564. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>

Inoue, L. A. K. A., Santos Neto, C. D., & Moraes, G. (2004). Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. *Ciência Rural*, 34, 563-565. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000200035>

International Trade Centre. International trade in goods statistics by product Exports 2001-2018: fish. Disponível em: <http://www.intracen.org/itc/market-info-tools/statistics-export-productcountry>

Ip, Y., Chew, S. F. (2010). Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in Physiology*, 1. doi:10.3389/fphys.2010.00134

Ip, Y. K., Chew, S. F., Randall, D. J., (2001). Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. In: Wright, P.A., Anderson, P.M. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 20. Academic Press, New York, pp. 109–148. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20005-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20005-3)

Lim, C.B., Chew, S.F., Anderson, P.M., Ip, Y.K., (2001). Reduction in the rates of protein and amino acid catabolism to slow down the accumulation of endogenous ammonia: a strategy potentially adopted by mudskippers (*Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*) during aerial exposure in constant darkness. *J. Exp. Biol.* 204, 1605–1641. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.9.1605>

- Lim, L. C., Dhert, P. & Sorgeloos, P. (2003). Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* 34, 923–935. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00946.x>
- Magdaleno Roman, J. Y., & González, C. C. (2024). Glutamate and excitotoxicity in central nervous system disorders: ionotropic glutamate receptors as a target for neuroprotection. *Neuroprotection*, 2(02), 137-150. DOI: 10.1002/nep3.46
- Martinez, C. D. R., Azevedo, F. D., & Winkaler, E. U. (2006). Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. CYRINO, JEP; URBINATI, EC Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 81-95.
- Martins, K. V. B., Silva, S. B., da Silva Cardoso, A. J., Salaro, A. L., Ferreira, P. D. M. F., Freitas, M. B., & Zuanon, J. A. S. (2024). Effectiveness and safety of clove oil and common salt in the long-term transport of *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 583, 740532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740532>
- Martins, T., Valentim, A., Pereira, N., & Antunes, L. M. (2019). Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. *Laboratory Animals*, 53(4), 325-341. <https://doi.org/10.1177/0023677218815199>
- Mello, R. F. (1999). Influência da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e resistência à hipoxia em alevinos de piaussú (*Leporinus obtusidens*). Piracicaba, USP, 41 p. (Dissertação mestrado).
- Nelson, D. L. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* 5th Edition. Proteins, 5, 6.
- Pezzato, L., Scorvo Filho, J. D., & Valenti, W. C. (2000). Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. *Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia*, p.399. ISBN: 85-87632-09-4
- Portz, D. E., Woodley, C. M., Cech, J. J., (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16 (2), 125–170. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>.
- Pramod, P. K., Ramachandran, A., Sajeevan, T. P., Thampy, S. & Pai, S. S. (2010). Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). *Aquaculture Research* 41, 309–314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02333.x>
- Randall, D. J. (2011). NITROGENOUS-WASTE BALANCE | Excretion of Ammonia. *Encyclopedia of Fish Physiology*, 1437–1443. doi:10.1016/b978-0-12-374553-8.00032-0
- Randall, D. J., & Tsui, T. K. N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- Randall, D. J., Burggren, W., French, K., & Eckert, R. (2002). *Eckert animal physiology*. Macmillan.
- Rezende, F. P.; Fujimoto, R. Y. (Ed.). *Peixes ornamentais no Brasil: mercado, legislação, sistemas de produção e sanidade*. Brasília, DF: Embrapa, 2021.

- Saccol, E. M. H., Londero, E. P., Bressan, C. A., Salbego, J., Gressler, L. T., Silva, L. V. F., et al. (2017). 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 <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2016.08.005>
- Sampaio, F. D. 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(4), 1055–1072. <https://doi.org/10.1111/faf.12158>
- Sladky, K. K., Swanson, C. R., Stoskopf, M. K., Loomis, M. R., and Lewbart, G. A. (2001). Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337–342. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>
- Spanghero, D. B. N., Spanghero, E. C. A. D. M., Pedron, J. D. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Zaniboni-Filho, E. (2019). Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 54, e00367. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00367>
- Teixeira, R. R., Souza, R. C., Sena, A. C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Couto, R. D., et al. (2017). Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquac. Res.* 48, 3383–3392. <https://doi.org/10.1111/are.13165>
- Thomas, P., and Robertson, L. (1991). Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture* 1, 69–86. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90140-3)
- Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S., and Padros, F. (2002). Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anesthetics clove oil and 2- phenoxyethanol. *Aquac. Res.* 33, 907–910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00741.x>
- Twitchen, I. D.; Eddy F. B. (1994). Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. in R. Müller and R. Lloyd (Editores), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books, Londres, p. 135-147.
- Usepa (1998). Addendum to “Ambient water quality criteria for ammonia—1984”. National Technical Information Service, Springfield, VA.
- Vanderzwalmen, M., Eaton, L., Mullen, C., Henriquez, F., Carey, P., Snellgrove, D., & Sloman, K. A. (2019). The use of feed and water additives for live fish transport. *Rev Aquac* 11 (1): 263–278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>
- Wagner, E., Arndt, R., and Hilton, B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211, 353–366. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00878-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00878-X)
- Wee, N. L., Tng, Y. Y., Cheng, H. T., Lee, S. M., Chew, S. F., & Ip, Y. K. (2007). Ammonia toxicity and tolerance in the brain of the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 82(3), 204-213. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.015>

Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J., & Xie, J. (2021). Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. *Animals*, 11(11), 3304. <https://doi.org/10.3390/ani11113304>

Ying, F., Juanjuan, L., & Jie, P. (2018). A Review: Toxicity of Ammonia-N to Fish and Detoxification Strategy of Fish. *Animal Husbandry & Feed Science*, 10. 10.19578/j.cnki.ahfs.2018.05-06.008

Óleos essenciais como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio*

Óleos essenciais como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio*

RESUMO

A amônia é um dos principais fatores causadores de perdas, tanto em ambientes de cultivo, como durante o transporte de peixes, por causar danos em brânquias, fígado, rins e sistema nervoso, natação errática, convulsões e morte. Portanto, é necessária a busca por aditivos que reduzam a excreção de amônia e contribuam para a manutenção da qualidade da água. Deste modo, objetivamos avaliar a eficácia e segurança dos óleos de cravo, *Syzygium aromaticum*, orégano, *Origanum vulgare*, e melaleuca, *Melaleuca alternifolia* como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio*. Foram realizados três experimentos independentes, em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram avaliadas as concentrações 0; 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo; 0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mg/L de óleo de orégano, e 0; 8,75; 17,5; 26,75 e 35 mg/L de óleo de melaleuca. Os peixes foram mantidos durante 24h em aquários de vidro de 20 L dotados de aeração e temperatura controlada ($24,5 \pm 0,46$ °C), contendo 30 peixes/aquário nos experimentos com os óleos de orégano e melaleuca, e 20 peixes/aquário no experimento com óleo de cravo. Cada aquário foi considerado uma unidade experimental. Foram avaliadas as seguintes variáveis: amônia total (AT), amônia não ionizada (ANI), taxa de excreção de amônia (TAN), oxigênio dissolvido e pH da água, bem como a glicose sanguínea dos peixes. Todas as concentrações dos óleos avaliados causaram redução de AT, ANI e TAN, contudo, as concentrações mais baixas (3,75 mg/L de óleo de cravo; 1,25 de óleo de orégano e 8,75 de óleo de melaleuca) apresentaram melhor custo/benefício por serem tão eficazes na redução da excreção de amônia quanto as concentrações mais altas, e serem menos onerosas. As concentrações mais altas de todos os óleos avaliados (11,25 e 15,0 mg/L de óleo de cravo; 2,5; 3,75 e 5,0 mg/L de óleo de orégano e 26,25 e 35,0 mg/L de óleo de melaleuca) causaram estresse nos peixes (aumento da glicemia) e, portanto, não são consideradas seguras. Assim, as concentrações máximas possíveis a serem utilizadas para juvenis de carpa são 7,5 mg/L de óleo de cravo; 1,25 mg/L de óleo de orégano e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca. Contudo, considerando a eficácia na redução de excreção de amônia e os custos do uso dos óleos, as concentrações recomendadas para juvenis de *C. carpio* são 3,75 mg/L de óleo de cravo; 1,25 de óleo de orégano e 8,75 de óleo de melaleuca.

Palavras-chave: Nitrogênio amoniacal. Extratos vegetais. Peixes ornamentais. Sedação.

1. Introdução

A manutenção da qualidade de água é fundamental para fornecer condições adequadas a manutenção, crescimento, desenvolvimento e reprodução de peixes por ser o meio onde os esses obtêm o oxigênio e íons, bem como onde eliminam excretas tóxicas e regulam o pH interno através das brânquias (Evans et al., 2005). A respiração e a eliminação de urina e fezes causam deterioração da qualidade da água como redução no teor de oxigênio dissolvido, alterações de pH e acúmulo de amônia, que podem comprometer a saúde dos peixes. Dentre as variáveis de qualidade de água, a amônia é um dos principais fatores causadores de perdas, tanto em ambientes de cultivo, como durante o transporte (Ip & Chew, 2010).

A amônia apresenta-se de duas formas: ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3), que se encontram em equilíbrio ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$), influenciado pelo pH e temperatura do meio (Baldisserotto, 2014). A amônia não ionizada é considerada mais tóxica do que o íon amônio por ser livremente difusível pelas membranas biológicas. A excreção de amônia se dá principalmente na forma de NH_3 , de forma passiva a favor de seu gradiente de concentração, entre o sangue nas brânquias e a água (Boyd, 1996; Bombardeli et al. 2003). Porém, com o aumento de amônia na água, a sua excreção fica reduzida, acumulando no meio interno dos peixes e causando intoxicação (Xu et al., 2021). Os mecanismos pelos quais a amônia é tóxica para peixes ainda não são completamente conhecidos. O principal efeito se dá no sistema nervoso central que leva a natação errática, convulsões e morte. Altos níveis de amônia podem levar à despolarização da membrana de células do sistema nervoso devido a entrada de NH_4^+ por canais de potássio (Randall & Tsui, 2002). Além disso, a liberação de glutamato pelos astrócitos pode causar hiperativação de receptores NMDA e a ativação de diversas vias de sinalização intracelular que causam estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e morte celular (Roman & González, 2024). O excesso de amônia também pode comprometer a síntese de ATP, causar danos em brânquias, fígado e rins e diminuição na atividade do sistema imune (Xu et al., 2021). Portanto, é necessária a procura por aditivos que possam reduzir a excreção de amônia na água, uma vez que esta é o principal fator causador de perdas durante o transporte de longa duração (Sampaio & Freire, 2016).

Alguns óleos essenciais com atividade anestésica/sedativa têm sido avaliados como aditivos na água de transporte de diversas espécies de peixes, pois podem reduzir a taxa metabólica e, conseqüentemente, reduzir a excreção de amônia. Dentre os óleos essenciais com essas características destaca-se o cravo-da-índia, *Syzygium aromaticum*, o principal anestésico natural para peixes, utilizado devido suas propriedades antimicrobiana, antioxidante,

miorrelaxante e imuno estimulante (Hajek, Klyszejko & Dziaman, 2006; Fujimoto et al., 2018; Abdelkhalek et al., 2020), além de ser de baixo custo e de fácil obtenção (Mitjana et al., 2014). Contudo, apesar de muitos autores considerarem o óleo de cravo seguro para peixes, ele pode aumentar respostas de estresse (King et al., 2005), causar danos em brânquias, distúrbios osmorregulatórios, estresse oxidativo (Afifi et al., 2000; Sink & Neal, 2009; Velisek et al., 2011) e efeitos genotóxicos (Bona et al., 2024). Portanto, é necessário avaliar outros óleos essenciais com propriedades semelhantes que sejam eficazes na redução da excreção de amônia, e seguros para os peixes. Os óleos de melaleuca, *Melaleuca alternifolia*, e de orégano, *Origanum vulgare*, além de suas propriedades sedativa/anestésica, antimicrobiana, antioxidante, imunoestimulante, analgésica e antiinflamatória (Borotová et al., 2022; Nova et al., 2024; Moghrovyan et al., 2022; Drăgan et al., 2022) apresentam boa disponibilidade no mercado. Além disso, o óleo de melaleuca não apresenta efeito genotóxico (Bona et al., 2024) e o óleo de orégano apresenta menor tempo de indução a anestesia (Gabriel et al., 2022) e menor efeito estressor quando comparado ao óleo de cravo (Bodur et al., 2018b). Deste modo, objetivamos avaliar a eficácia e segurança dos óleos de cravo, orégano e melaleuca como redutores da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio*, uma importante espécie ornamental, comercializada no mundo todo (Ariel, 2005; Duan et al., 2009; Singh & Lakra, 2011).

2. 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 n° 054/2016 (Anexo I).

Foram realizados três experimentos no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP) do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa para avaliar a eficácia e segurança dos óleos de cravo, *Sysygium aromaticum*, orégano, *Origanum vulgare* e melaleuca, *Melaleuca alternifolia*, para juvenis de *Cyprinus carpio*.

Os peixes foram obtidos de uma piscicultura ornamental localizada no município de Laje do Muriaé, Minas Gerais (Piscicultura Sol Nascente®) e mantidos em aquários de 500 L dotados de filtro biológico, aeração e aquecedores com termostato ($25 \pm 0,5$ °C) e fotoperíodo de 12/12h. Os peixes foram alimentados com uma ração comercial (GuabiTech Inicial Alevinos®) com 45 % de proteína bruta (PB), três vezes ao dia (8 h, 12 h e 16 h). Antes da realização de cada experimento, os peixes foram submetidos a jejum de 12 h (Reis, 2015). O jejum, como preparação para o transporte, é essencial para reduzir a presença de fezes na água e, assim, diminuir a quantidade de sólidos suspensos disponíveis como substrato para os microrganismos se desenvolverem e comprometerem a qualidade da água, como redução do pH e aumento de amônia, bem como causar danos físicos nas brânquias (Harmon, 2009).

Nos três experimentos foram utilizados delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (diferentes concentrações de óleos essenciais) e quatro repetições, sendo cada aquário considerado uma unidade experimental. Para o óleo de cravo foram avaliadas as concentrações 0; 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mg L⁻¹, para o orégano 0; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mg L⁻¹, e para melaleuca 0; 8,75; 17,5; 26,25 e 35 mg L⁻¹. As concentrações máximas toleradas por juvenis de *C. carpio* foram estabelecidas em ensaios prévios com base na sobrevivência dos peixes durante exposição por 24h.

Juvenis de *C. carpio* ($1,23 \pm 0,1$ g) foram mantidos em aquários de vidro de 20 L dotados de aeração e termostatos para manutenção da temperatura a $24,5 \pm 0,46$ °C. Nos experimentos com os óleos de orégano e melaleuca foram utilizados 30 peixes/aquário, enquanto no experimento do óleo de cravo foram utilizados 20 peixes/aquário. Como os óleos essenciais apresentam baixa solubilidade em água foi preparada uma solução estoque de cada óleo diluído em álcool etílico absoluto (solução estoque 10%). Para se obter as concentrações de cada óleo a serem avaliadas, diferentes quantidades da solução estoque foram diluídas na água do aquário.

2.1. Qualidade de água

Foram mensurados na água a temperatura e o oxigênio dissolvido, por meio de oxímetro digital (INSTRUTHERM® MO-920), e o pH, por meio de pHmetro digital (MS TECNOPON® TEC-7p). A amônia total foi mensurada na água filtrada (filtro de 14 µm), cinco vezes ao dia, durante 24 horas por meio de medidor digital (HANNA® Instruments - HI706 *medium*) utilizando reativo de Nessler, onde uma massa de 12,13 g de tiocianato de mercúrio (II) foi dispersa em 100 ml de água. Sobre a dispersão, sob agitação magnética, foi adicionado 27,1 g de iodeto de potássio e 20 ml de hidróxido de sódio 9 mol/L (ou 7,2 g de hidróxido de sódio). A solução foi armazenada em frasco de vidro. A amônia não ionizada foi calculada com base na fórmula:

$$Amônia\ não\ ionizada = \frac{amônia\ total}{\left[1 + 10 \left\{ (0,0902 - pH) + \left(\frac{2730}{273,3 + temperatura} \right) \right\} \right]}$$

2.2. Segurança do uso de óleos essenciais

Para avaliar a segurança dos óleos essenciais para juvenis de *C. carpio*, ao final de 24h de exposição aos óleos essenciais foram avaliadas a sobrevivência e a glicemia sanguínea como resposta de estresse. A cada 6h foi observada a mortalidade dos peixes para o cálculo da taxa de sobrevivência. Para avaliar as respostas de estresse foi mensurada a glicose sanguínea de 5 peixes antes do experimento e de 3 peixes/aquário ao final das 24 horas de cada experimento. O sangue foi coletado por meio de um corte no pedúnculo caudal com tesoura cirúrgica e depositado diretamente em tiras reagentes do aparelho monitor digital para leitura de glicose (On-Call® Plus II). Os peixes foram eutanasiados por atordoamento seguido de secção medular, por meio da utilização de tesoura cirúrgica, de acordo com o item 9.7.3 da resolução do CONCEA (2018).

2.3. Análise estatística

A avaliação da excreção de amônia pelos peixes em função do tempo foi realizada por meio de análise de variância e regressão polinomial ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o software R® 3.6.1 (pacote ExpDes.pt) de forma independente para cada óleo essencial avaliado. A comparação dos betas 1 das expressões matemáticas que mostram os efeitos de cada óleo essencial sobre amônia total e amônia não ionizada, foi realizada por meio do teste Tukey.

A avaliação dos efeitos de cada óleo essencial sobre a amônia total e não ionizada na água, taxa de exceção de amônia, oxigênio dissolvido, pH da água e glicose sanguínea foi realizada por meio de análise de variância e regressão polinomial ou modelo descontínuo (LRP) ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o software R® 3.6.1 (pacote ExpDes.pt). Para a comparação das médias dos tratamentos com diferentes concentrações de cada óleo foi realizado o teste Tukey. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e para verificar a homogeneidade das variâncias, o teste Bartlett. Para escolha do modelo de regressão foi considerado o nível de significância dos coeficientes de regressão, o comportamento das variáveis em estudo e a magnitude dos coeficientes de determinação.

3. Resultados

3.1. Óleo essencial de cravo

Houve efeito linear crescente do tempo ($p < 0,05$) sobre o teor de amônia total (AT) e amônia não ionizada (ANI) na água para todas as concentrações de óleo de cravo avaliadas. A comparação dos coeficientes de regressão das expressões matemáticas da AT em função do tempo mostrou que as concentrações de 3,75; 7,5 e 11,25 mg/L de óleo de cravo diferiram do controle ($p < 0,05$), porém não diferiram entre si. A concentração de 15 mg/L de óleo de cravo não diferiu dos demais tratamentos ($p > 0,05$). Para ANI, os coeficientes de regressão dos tratamentos 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo diferiram do controle ($p < 0,05$), mas não diferiram entre si (Figs. 2 e 3).

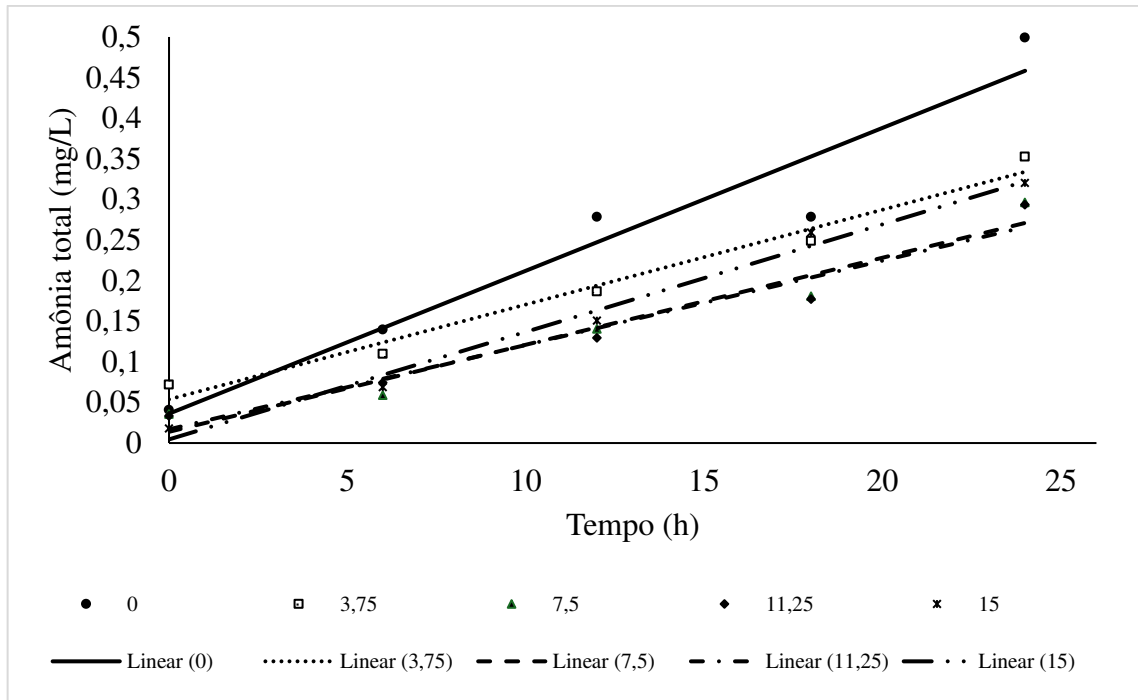


Figura 2. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. $p = 0,000062$. • $AT_0 = 0,036150 + 0,017592x$; $R^2 = 0,73$; □ $AT_{3,75} = 0,053750 + 0,011675x$; $R^2 = 0,74$; ▲ $AT_{7,5} = 0,013800 + 0,010717x$; $R^2 = 0,80$; ◆ $AT_{11,25} = 0,01685 + 0,01038x$; $R^2 = 0,82$; × $AT_{15} = 0,0044500 + 0,0132375x$; $R^2 = 0,92$.

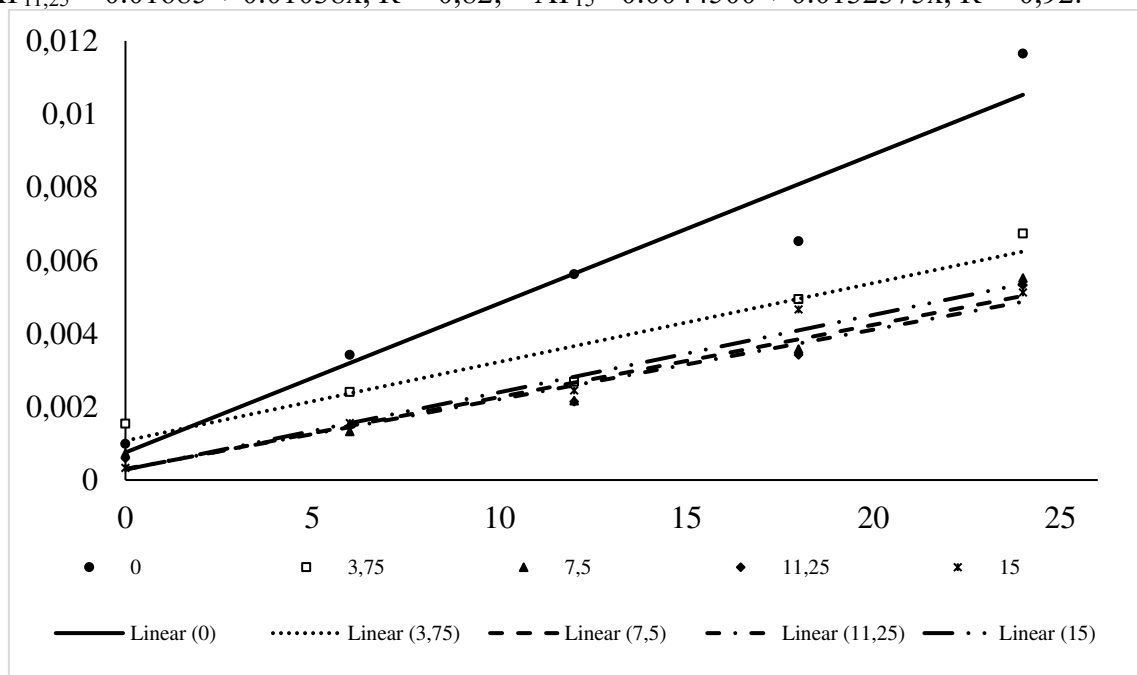


Figura 3. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. $p = 0,000131$. • $ANI_0 = 0,000755 + 0,0004075x$; $R^2 = 0,72$; □ $ANI_{3,75} = 0,00107 + 0,0002158x$; $R^2 = 0,78$; ▲ $ANI_{7,5} = 0,00028 + 0,0001988x$; $R^2 = 0,73$; ◆ $ANI_{11,25} = 0,00033 + 0,0001883x$; $R^2 = 0,82$; × $ANI_{15} = 0,0132375 + 0,0132375x$; $R^2 = 0,75$.

Para AT e ANI houve efeito quadrático do óleo de cravo ($p < 0,05$), com valores estimados que minimizam os teores de AT e ANI na água de 10,24 e 11,13 mg/L de óleo de cravo, respectivamente (Figs. 4 e 5). Com relação ao teste Tukey, todas as concentrações de óleo de cravo apresentaram valores menores ($p < 0,05$) de AT e ANI do que o controle, mas não diferiram entre si. A temperatura média da água foi de $24,54 \pm 0,17$ °C.

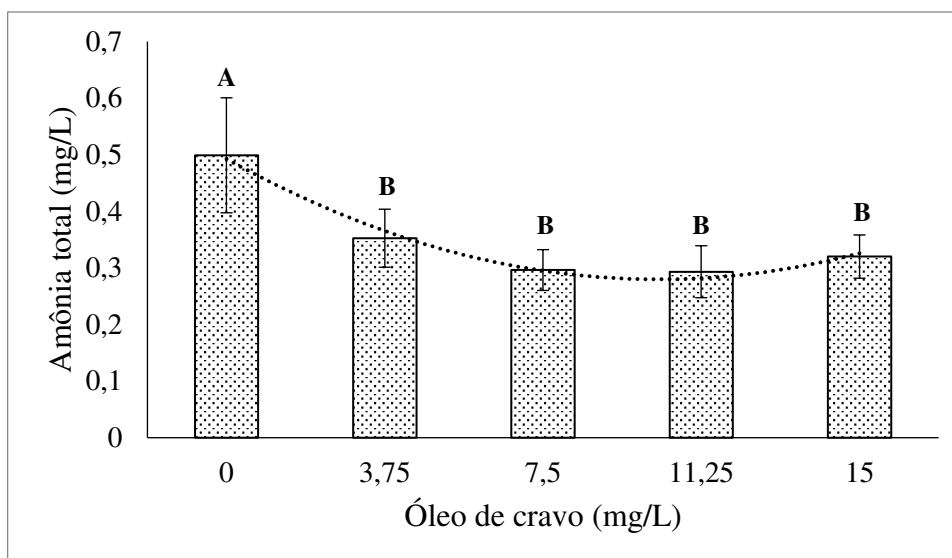


Figura 4. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água, durante 24h. $AT = 0,492757 - 0,041584x + 0,002031x^2$ com $R^2 = 0,68$. $p = 0,00103$. Min = 10,24 mg/L óleo de cravo. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

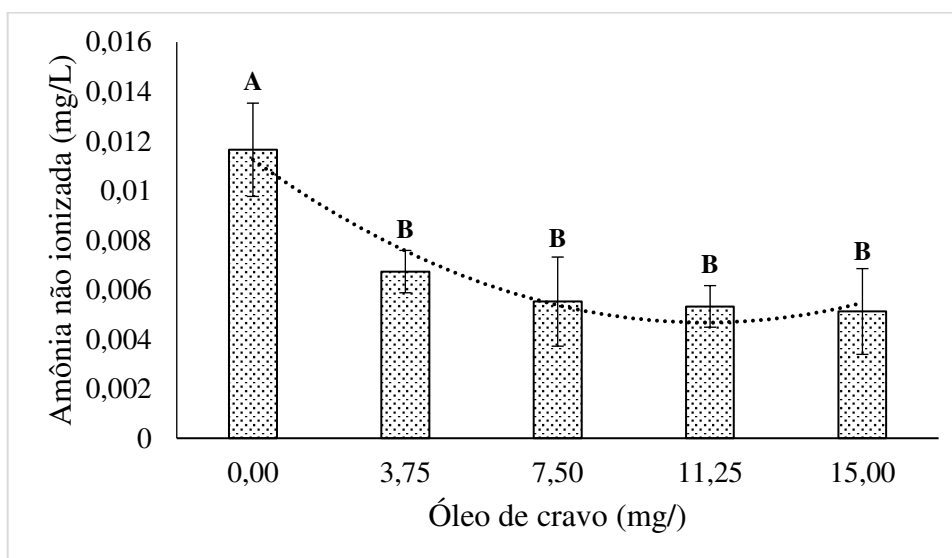


Figura 5. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água, durante 24h. $ANI = 0,01126 - 0,001184x + 0,00005321x^2$ com $R^2 = 0,75$. $p = 0,0000704$. Min = 11,13 mg/L óleo de cravo. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Para a taxa de excreção de amônia (TAN) observamos o melhor ajuste para o modelo descontínuo (LRP) do óleo de cravo ($p < 0,05$) com valor estimado do platô que minimiza a excreção de amônia de 3,77 mg/L. Pelo teste Tukey as concentrações 3,75; 7,5 e 11,25 foram menores do que o controle, mas não diferiram entre si. A concentração de 15 mg/L não diferiu do controle e das demais concentrações de óleo de cravo (Fig. 6).

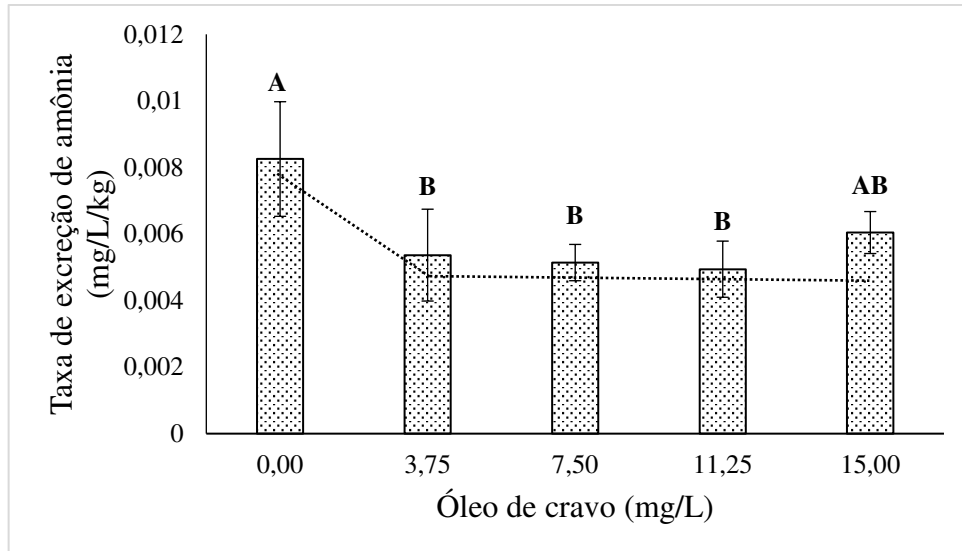


Figura 6. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo na água durante 24h. $TAN = 0,00825 - 0,00076x$; platô = 3,77 mg/L; $R^2 = 0,55$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00521$.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de cravo sobre o pH e oxigênio dissolvido na água (Figs. 7 e 8).

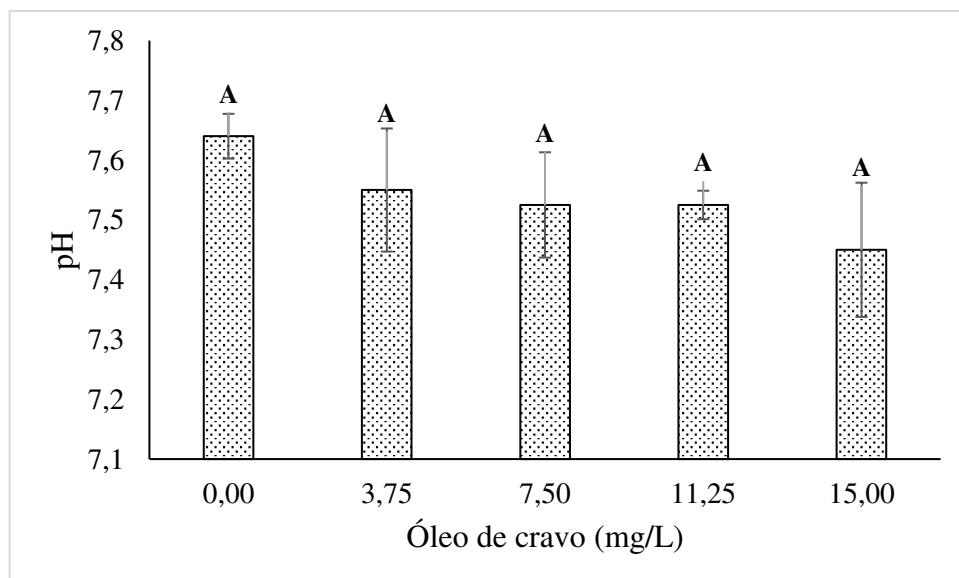


Figura 7. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0624$.

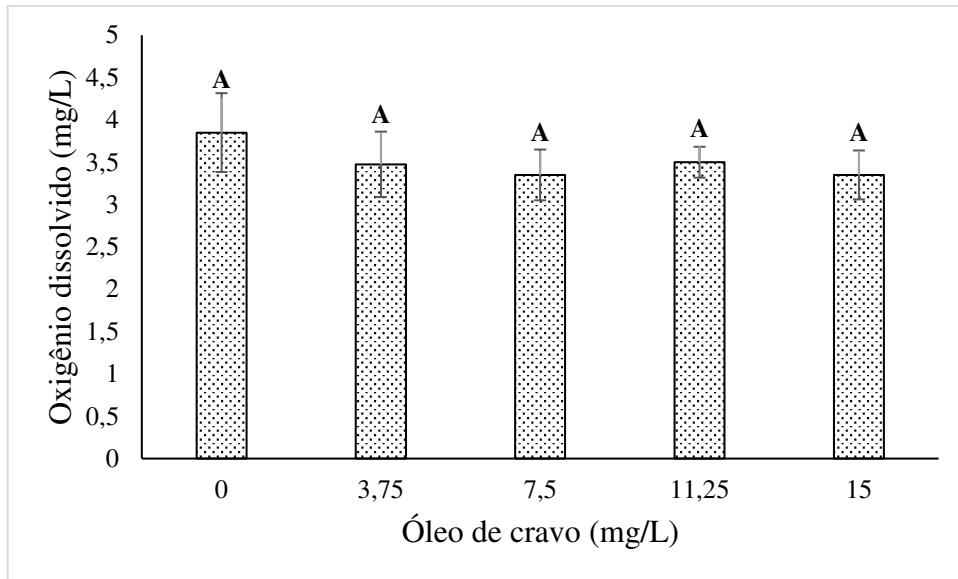


Figura 8. Oxigênio dissolvido na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de cravo durante 24h. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,261$.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de cravo sobre a sobrevivência de juvenis de carpas (Fig. 9).

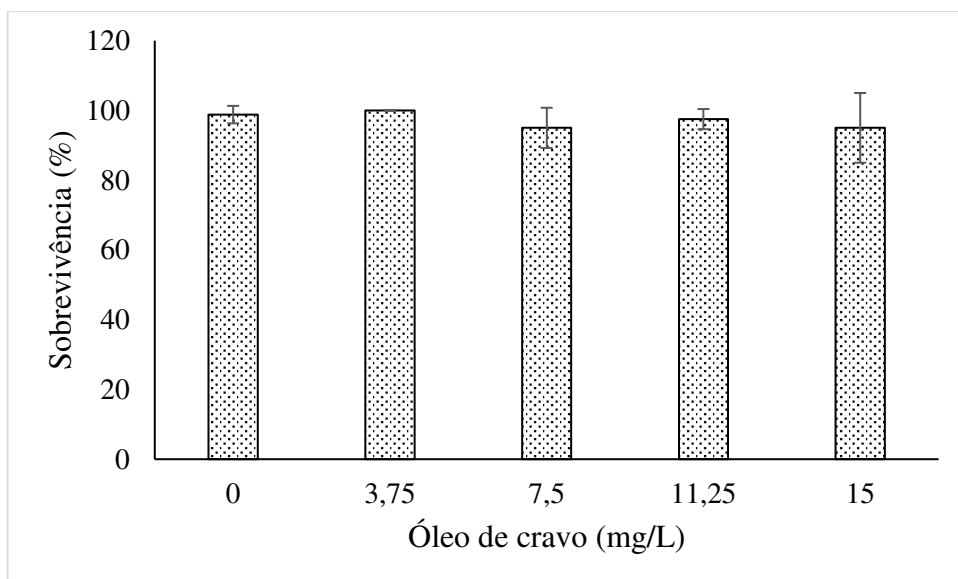


Figure 9. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de cravo por 24h.

Os valores de glicose sanguínea não apresentaram distribuição normal e homogeneidade da variância pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Contudo, após a conversão dos dados em log, observamos distribuição normal e homogeneidade da variância. Sendo assim, observamos efeito significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos sobre o teor de glicose sanguínea. O teor de glicose dos tratamentos 3,75 e 7,5 mg/L de óleo de cravo não diferiram

($p > 0,05$) dos valores observados antes do início do experimento, bem como não diferiram entre si. Os tratamentos com 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo diferiram do tratamento antes do experimento, porém, não diferiram entre si. Com relação ao tratamento controle, sem óleo de cravo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos com 7,5; 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo. O tratamento com 3,75 mg/L de óleo de cravo diferiu ($p < 0,05$) dos tratamentos 11,25 e 15 mg/L de óleo de cravo. Já, o tratamento com 7,5 mg/L diferiu do 11,25, mas não diferiu do 3,75 e do 15 mg/L de óleo de cravo (Fig. 10).

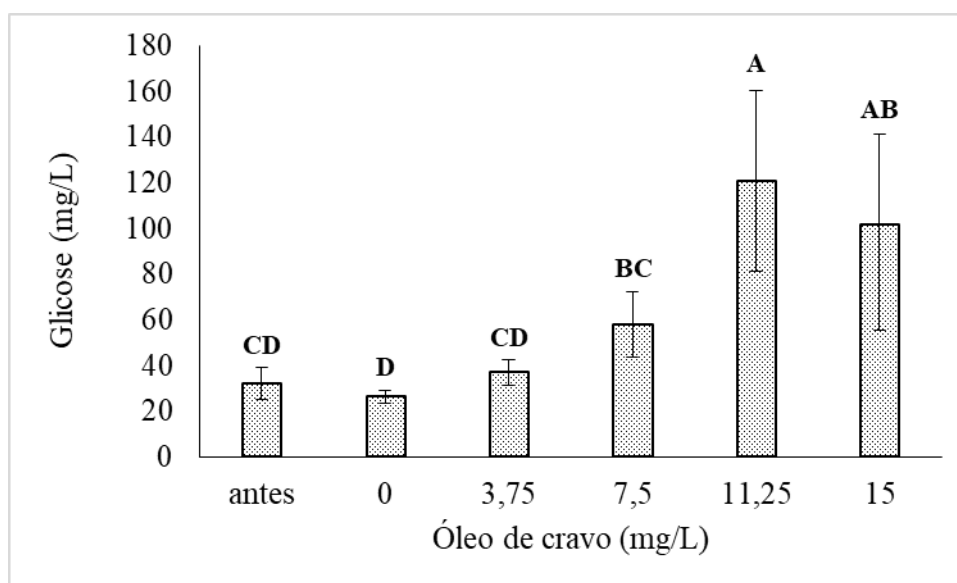


Figura 10. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de cravo durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000721$. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

3.2. Óleo essencial de orégano

Houve efeito linear crescente do tempo ($p < 0,05$) sobre o teor de AT e amônia ANI na água para todas as concentrações de óleo de orégano avaliadas. A comparação dos coeficientes de regressão das expressões matemáticas que mostram as relações entre o tempo e a AT e a ANI mostraram que as concentrações 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mg/L de óleo de orégano diferiram do controle ($p < 0,05$), porém não diferiram entre si (Figs. 11 e 12).

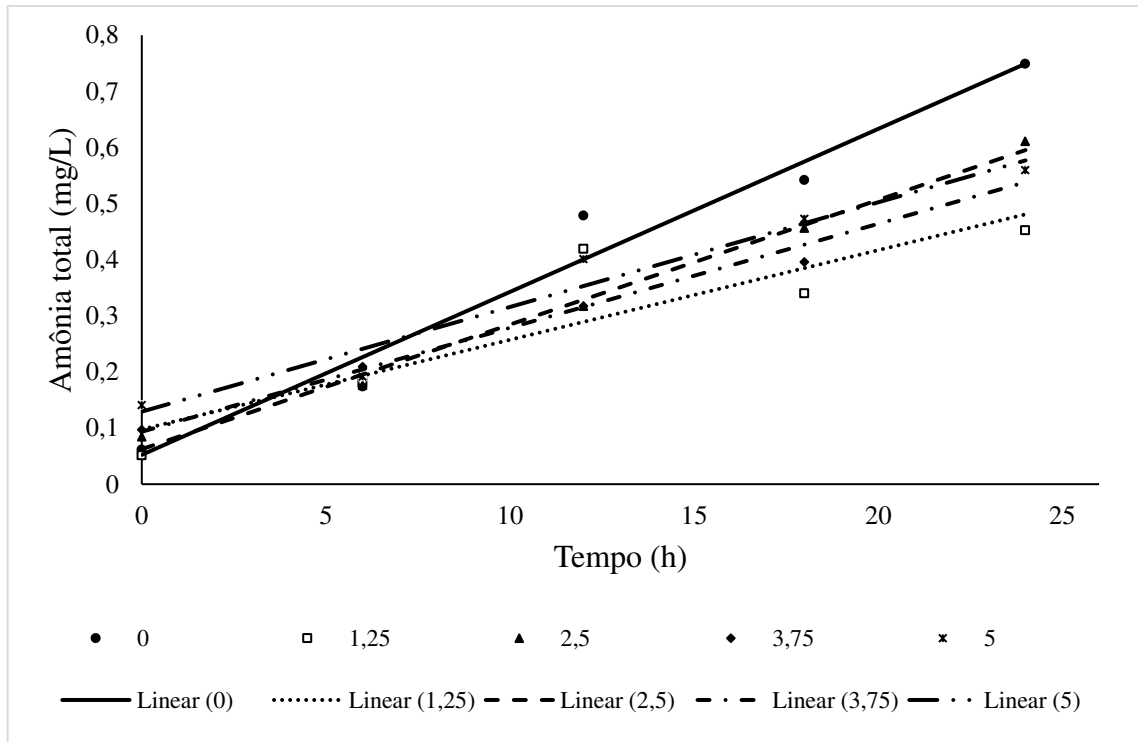


Figura 11. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $p = 0,00000000623$. • $AT_0 = 0,052200 + 0,029042x$; $R^2 = 0,91$; □ $AT_{1,25} = 0,097850 + 0,015950x$; $R^2 = 0,66$; ▲ $AT_{2,5} = 0,062500 + 0,022204x$; $R^2 = 0,89$; ◆ $AT_{3,75} = 0,09355 + 0,01852x$; $R^2 = 0,87$; × $AT_5 = 0,129300 + 0,018650x$; $R^2 = 0,87$.

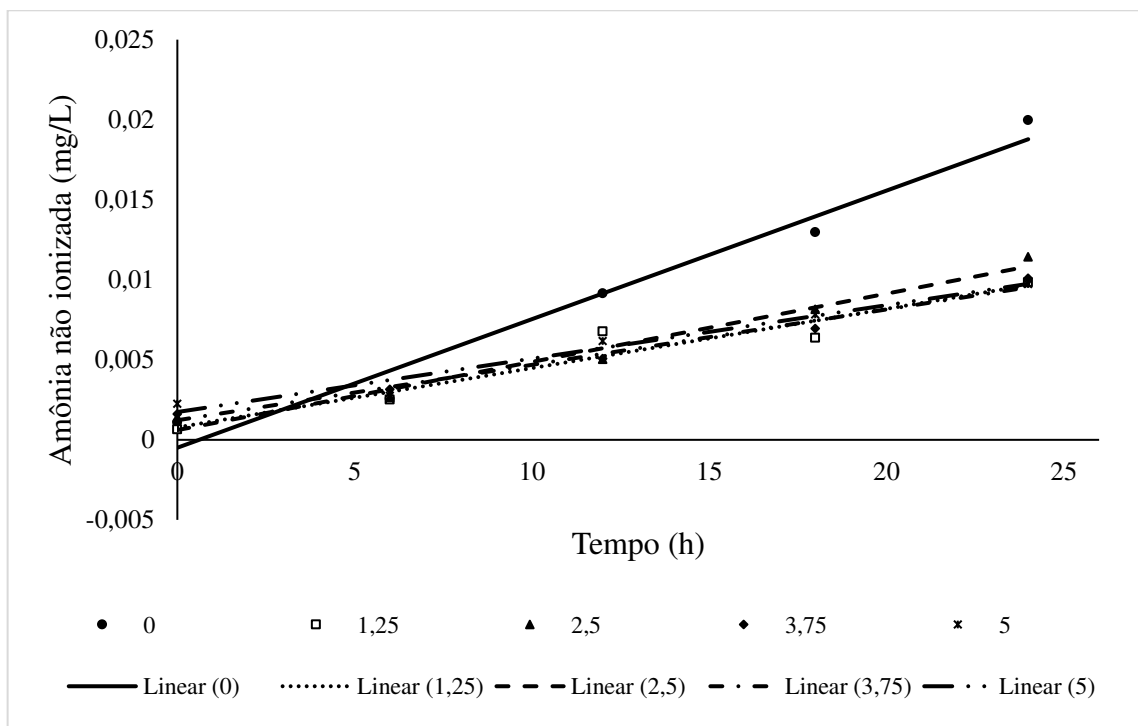


Figura 12. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $p = 0,00000222$. $AT_0 = -0,000496 + 0,0008032x$; $R^2 = 0,85$; □ $AT_{1,25} = 0,0007765 + 0,0003703x$; $R^2 = 0,70$; ▲ $AT_{2,5} = 0,000606 +$

$0,0004262x$; $R^2 = 0,88$; $\blacklozenge AT_{3,75} = 0,001224 + 0,000346x$; $R^2 = 0,86$; $\times AT_5 = 0,001739 + 0,0003335x$; $R^2 = 0,88$.

Para AT houve efeito quadrático do óleo de orégano ($p < 0,05$), com valores estimados que minimizam os teores de AT na água de 3,16 mg/L. (Fig. 13). Já para ANI, observamos o melhor ajuste ($p < 0,05$) para o modelo descontínuo (LRP) com valor estimado que minimiza a ANI de 1,32 mg/L de óleo de orégano (Fig. 14). A temperatura média da água foi de $23,85 \pm 0,21$ °C. Pelo teste Tukey todas as concentrações de óleo de orégano foram menores do que o controle, mas não diferiram entre si.

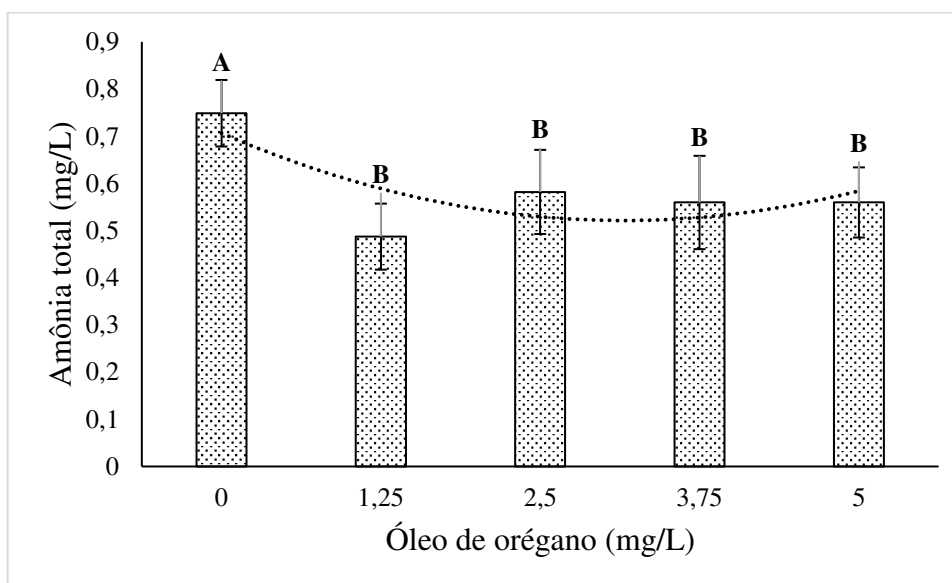


Figura 13. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água, durante 24h. $AT = 0,706471 - 0,117214x + 0,018551x^2$; $R^2 = 0,34$. $p = 0,00548$. Valor estimado que minimiza a AT = 3,16 mg/L óleo de orégano. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

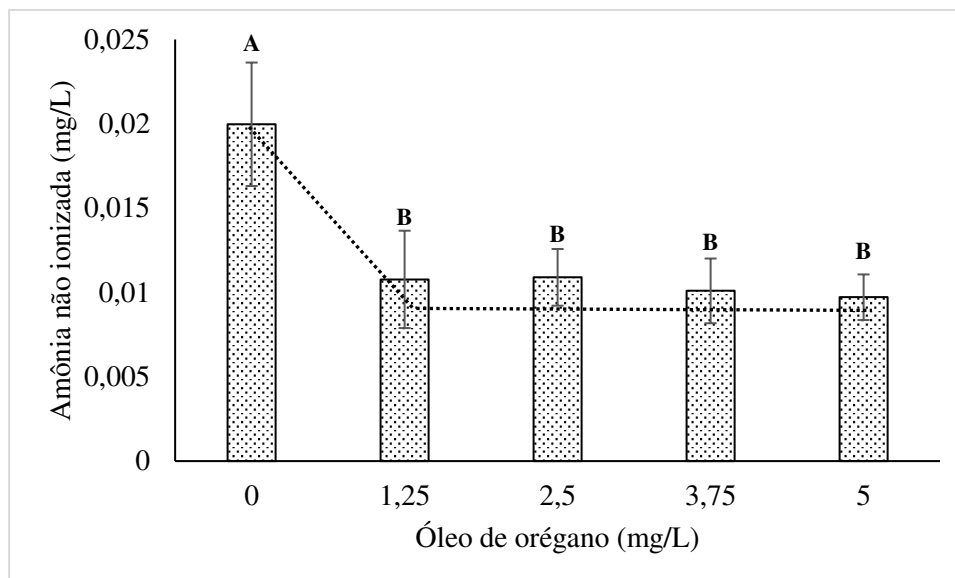


Figura 14. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água, durante 24h. ANI = $0,01995 - 0,00734x$; platô = 1,32 mg/L de óleo de orégano; $R^2 = 0,76$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,000117$.

Para a taxa de excreção de amônia (TAN) observamos efeito linear decrescente do óleo de orégano ($P < 0,05$). A comparação das médias pelo teste Tukey mostrou que as concentrações de 1,25 e 5 mg/L de óleo de orégano foram menores do que o controle ($p < 0,05$), porém não diferiram entre si. As concentrações de 2,5 e 3,75 mg/L de óleo de orégano não diferiram do controle, nem dos tratamentos 1,25 e 5 mg/L de óleo de orégano ($p > 0,05$) (Fig. 15).

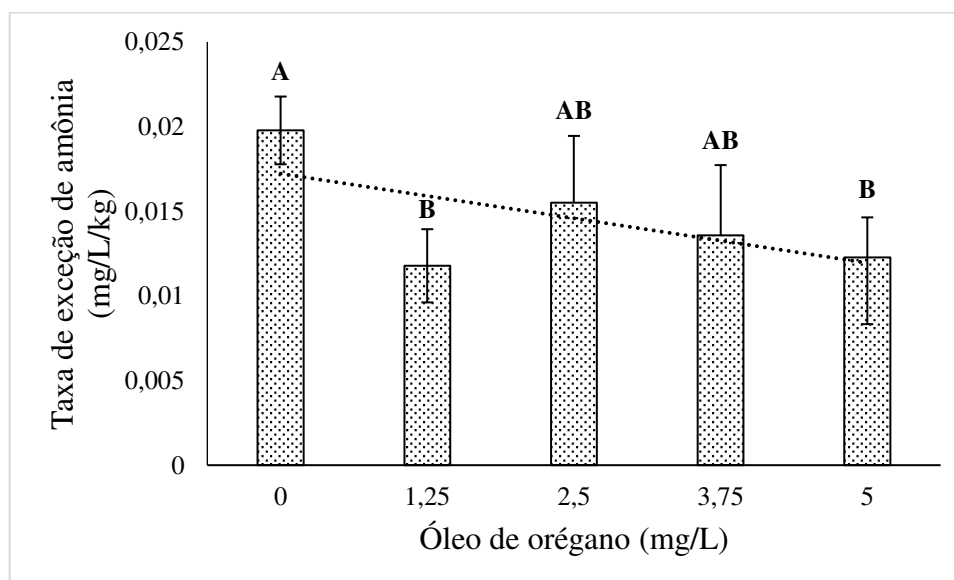


Figura 15. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de orégano na água durante 24h. TAN = $0,017225 - 0,001062x$; $R^2 = 0,23$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0138$.

Não houve efeito significativo ($p>0,05$) do óleo de orégano sobre a sobrevivência de juvenis de carpas com valores de 100 % para todos os tratamentos (Fig. 16).

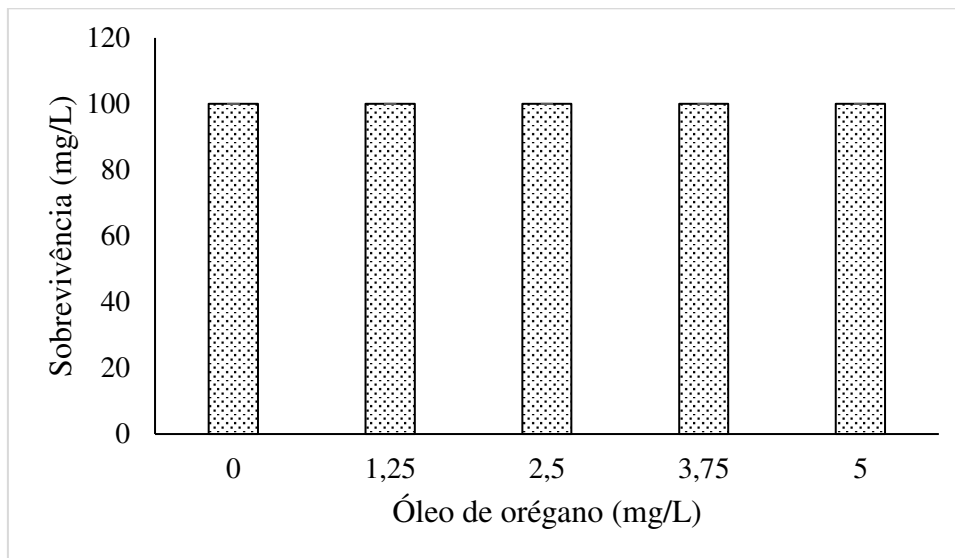


Figure 16. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de orégano por 24h.

Observamos efeito significativo ($p<0,05$) do óleo de orégano sobre o teor de glicose sanguínea. O teor de glicose dos tratamentos com 0 e 1,25 mg/L de óleo de orégano não diferiram ($p>0,05$) dos valores observados antes do início do experimento. Já os tratamentos com 2,5; 3,75 e 5 mg/L de óleo de orégano foram maiores do que a glicemia antes do experimento. Além disso, o tratamento com 1,25 mg/L de óleo de orégano não diferiu do controle (sem óleo de orégano), enquanto os tratamentos com 3,75 e 5 mg/L de óleo de orégano foram significativamente maiores ($p<0,05$) do que o controle. O tratamento com 3,75 mg/L de óleo de orégano foi maior ($p<0,05$) do que o tratamento de 1,25 mg/L de óleo de orégano. Já o tratamento com 5 mg/L foi maior do que 0; 1,25 e 2,5 mg/L de óleo, mas não diferiu do 3,75 mg/L de óleo de orégano (Fig. 17).

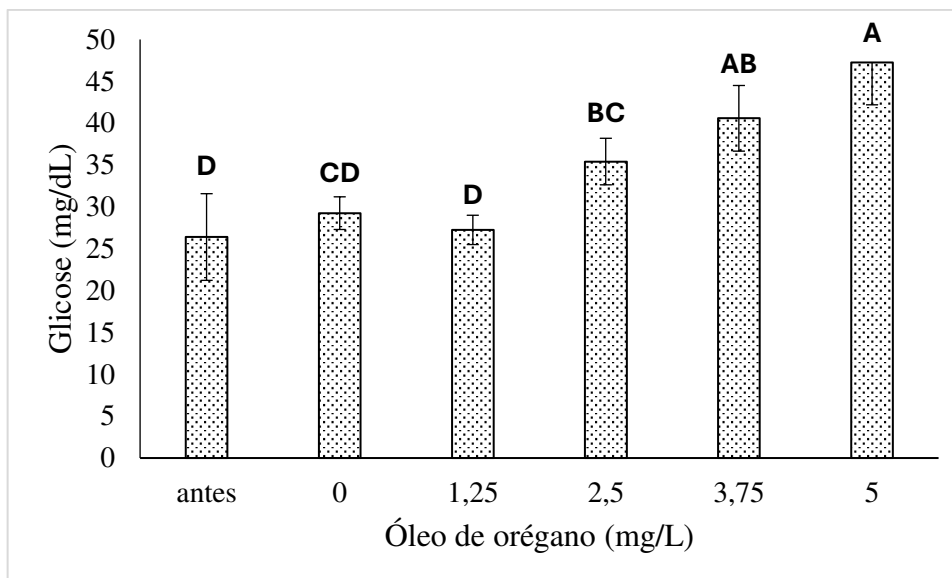


Figura 17. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000000112$.

Houve efeito linear decrescente do óleo de orégano ($p < 0,05$) sobre o pH da água (Fig 18). A comparação entre as médias pelo teste Tukey mostrou que o pH da água de todos os tratamentos contendo óleo de orégano foram inferiores ($p < 0,05$) do controle. O tratamento de 1,25 mg/L de óleo de orégano foi maior ($p < 0,05$) do que o com 5 mg/L de óleo de orégano, mas não diferiu ($p > 0,05$) dos tratamentos com 2,5 e 3,75 mg/L de óleo de orégano. Os tratamentos 2,5 e 3,75 não diferiram ($p > 0,05$) entre si.

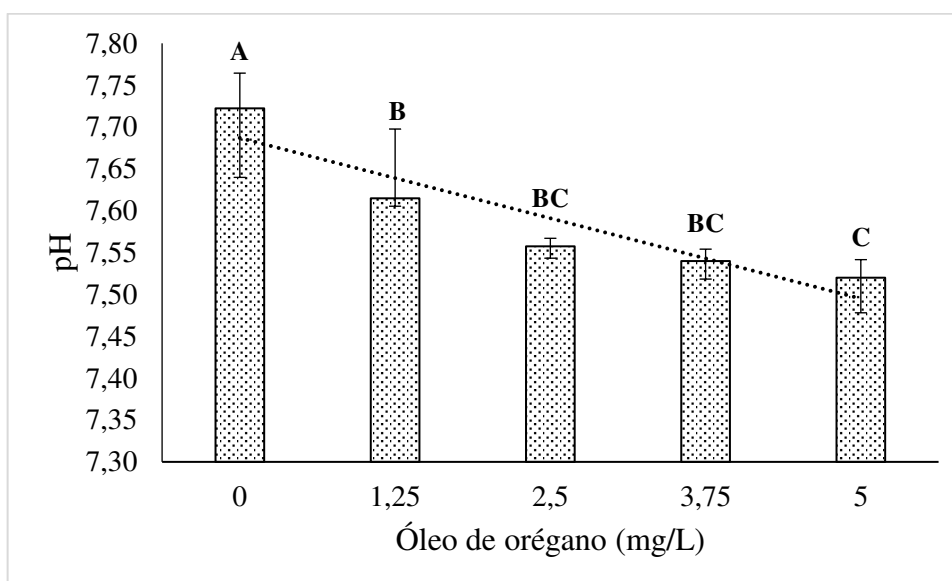


Figura 18. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $\text{pH} = 7,687 - 0,0384x$; $R^2 = 0,69$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000541$.

Observamos efeito quadrático do óleo de orégano ($p < 0,05$) sobre o oxigênio dissolvido na água (Fig. 19). A comparação das médias pelo teste Tukey mostrou que os valores de oxigênio dissolvido na água nos tratamentos de 2,5 e 3,75 mg/L de óleo de orégano foram menores do que o controle ($p < 0,05$), mas não diferem entre si. Os tratamentos com 1,25 e 5 mg/L de óleo de orégano não diferiram ($p > 0,05$) do controle e entre si.

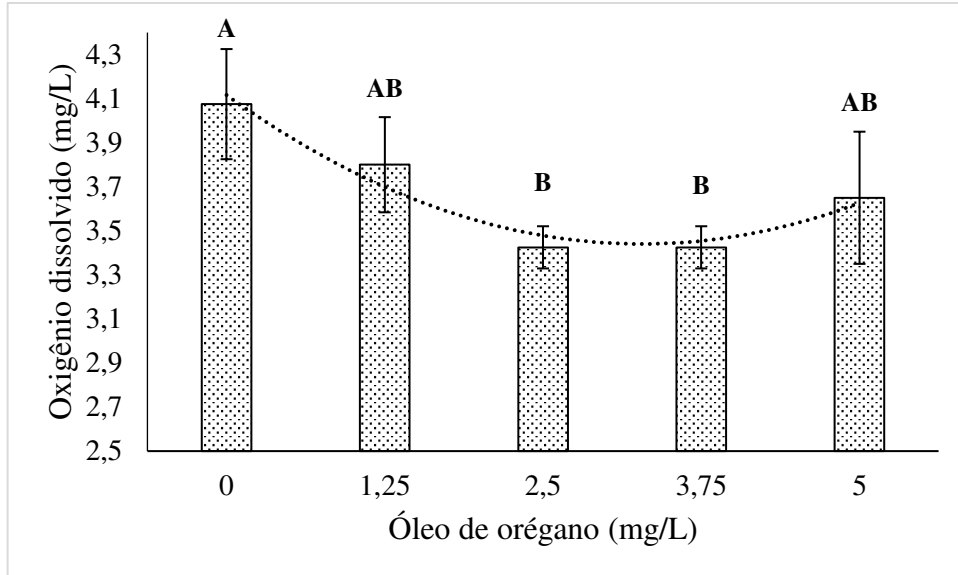


Figura 19. Oxigênio dissolvido (O_2) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de orégano durante 24h. $O_2 = 4,11643 - 0,41229x + 0,06286x^2$; $R^2 = 0,61$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00229$.

3.3. Óleo de melaleuca

Houve efeito linear crescente do tempo ($p < 0,05$) sobre o teor de amônia total (AT) e amônia não ionizada (ANI) na água para todas as concentrações de óleo de melaleuca avaliadas (Figs. 18 e 19). A comparação dos coeficientes de regressão das expressões matemáticas da AT em função do tempo mostrou que todas as concentrações de óleo de melaleuca foram menores do que o controle ($p < 0,05$). Os tratamentos 8,75; 17,0 e 35,0 não diferiram entre si ($p > 0,05$), bem como os tratamentos 8,75; 26,25 e 35,0 não diferiram entre si ($P > 0,05$). Já o tratamento 26,25 foi maior ($p < 0,05$) que o 17,5 de óleo de melaleuca (Fig. 20).



Figura 20. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. $p = 0,0000393$. • $AT_0 = 0,105260 + 0,044542x$; $R^2 = 0,94$; □ $AT_{8,75} = 0,114625 + 0,009412x$; $R^2 = 0,47$; ▲ $AT_{17,5} = 0,084485 + 0,012455x$; $R^2 = 0,50$; ◆ $AT_{26,25} = 0,152115 + 0,004910x$; $R^2 = 0,30$; × $AT_{35} = 0,126570 + 0,008941x$; $R^2 = 0,71$.

A comparação dos coeficientes de regressão das expressões matemáticas da ANI em função do tempo mostrou que todas as concentrações de óleo de melaleuca foram menores do que o controle ($p < 0,05$). Os tratamentos 8,75; 17,0 e 35,0 mg/L não diferiram entre si ($p > 0,05$), bem como os tratamentos 8,75; 26,25 e 35,0 mg/L não diferiram entre si ($p > 0,05$). Já o tratamento 26,25 foi maior ($p < 0,05$) que o 17,5 mg/L de óleo de melaleuca (Fig. 21).

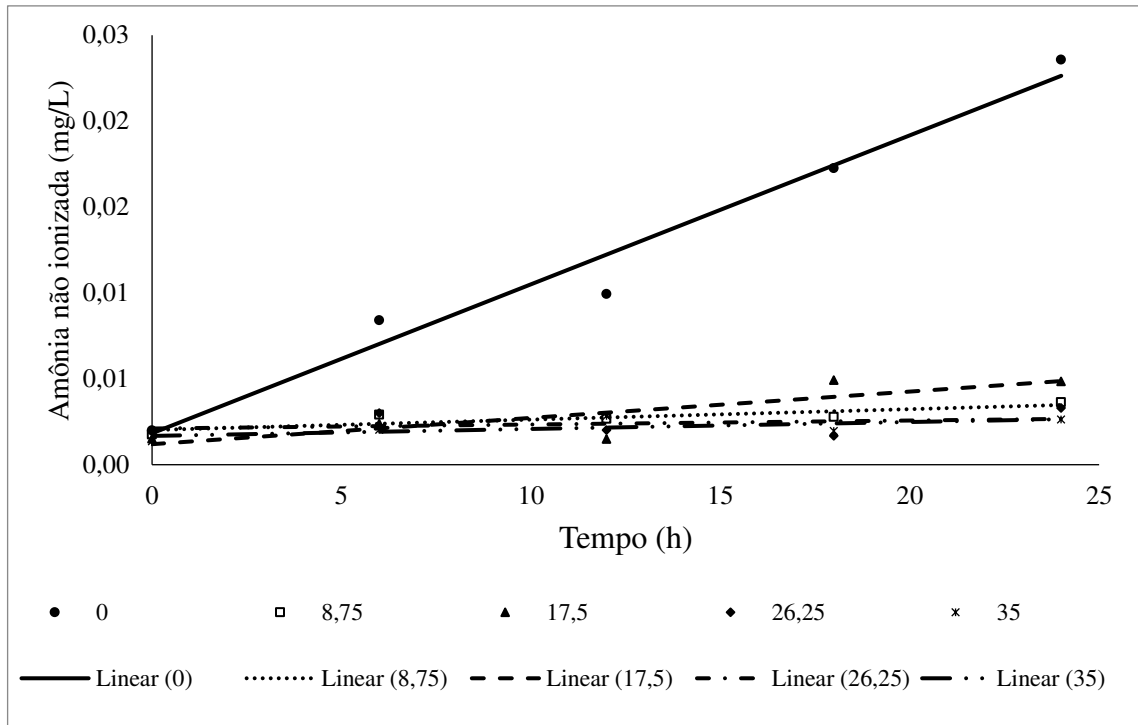


Figura 21. Amônia não ionizada (ANI) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. • $AT_0 = 0,001828 + 0,0008671x$; $R^2 = 0,84$. $p = 0,00000246$.

Para AT, houve efeito quadrático do óleo de melaleuca ($p < 0,05$), com valor estimado que minimiza o teor de AT na água de 23,45 mg/L de óleo de melaleuca. A comparação das médias de AT pelo teste Tukey mostrou que todas as concentrações de óleo de melaleuca apresentaram valores de AT menores do que o controle ($p < 0,05$), porém, não diferiram entre si (Fig. 22).

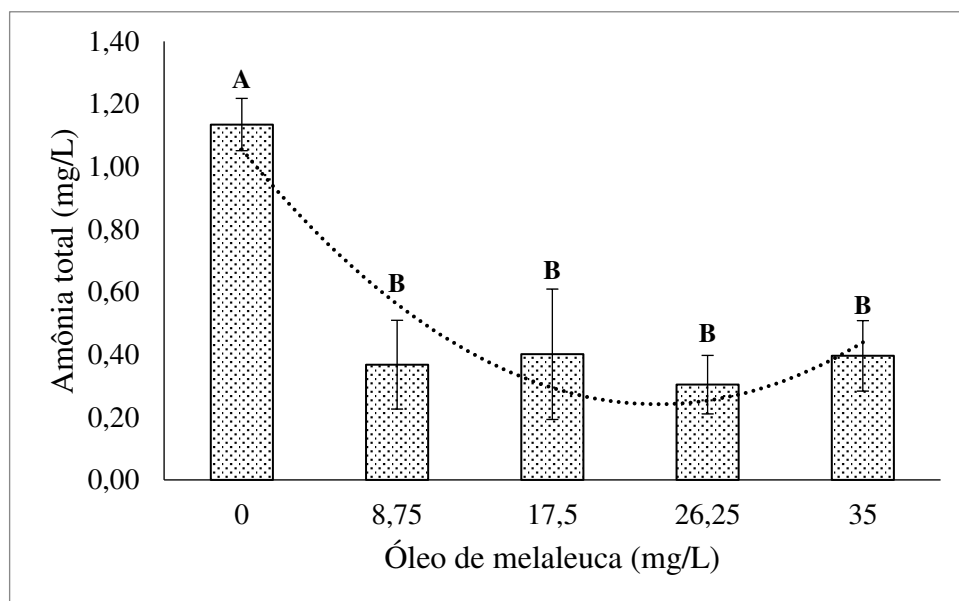


Figura 22. Amônia total (AT) na água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água, durante 24h. $AT = 1,0554986 - 0,0694148x +$

$0,0014802x^2$; $R^2 = 0,77$. Valor estimado que minimiza a AT = 23,45 mg/L óleo de melaleuca. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00000136$.

Para ANI, o melhor ajuste foi observado para o modelo descontínuo (LRP), com valor do platô igual a 8,82 mg/L de óleo de melaleuca (Fig. 23). Pelo teste Tukey todas as concentrações de óleo de melaleuca foram menores do que o controle, mas não diferiram entre si.

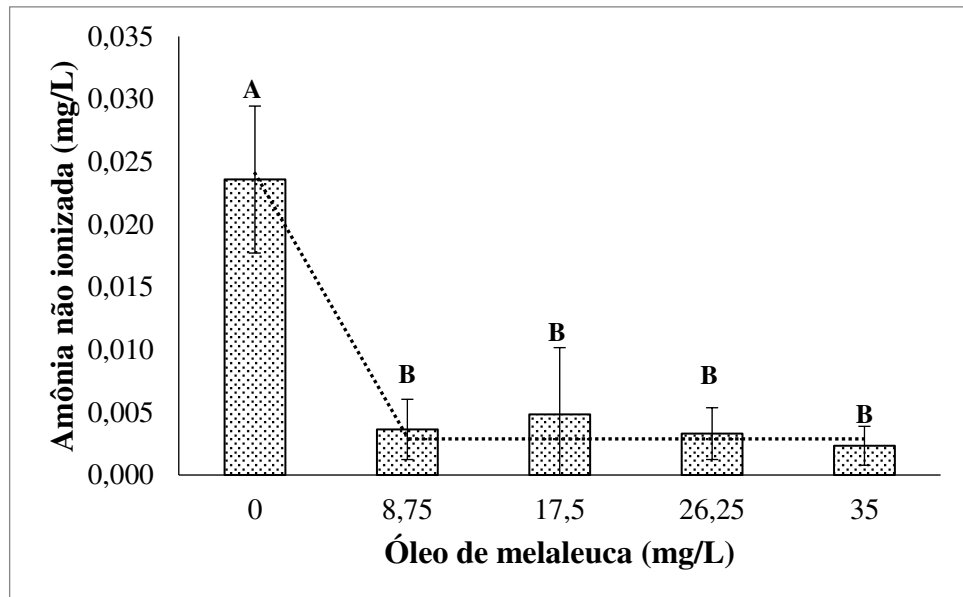


Figura 23. NH_3 da água de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água durante 24h. $\text{NH}_3 = 0,023575 - 0,0022771x$; platô = 8,82 mg/L; $R^2 = 0,84$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0000046$.

Para a taxa de excreção de amônia (TAN) foi observado o melhor ajuste ($p < 0,05$) para o modelo descontínuo (LRP), com valor estimado do platô igual a 8,98 mg/L de óleo de melaleuca. Pelo teste Tukey todas as concentrações de óleo de melaleuca foram menores do que o controle, mas não diferiram entre si (Fig. 24).

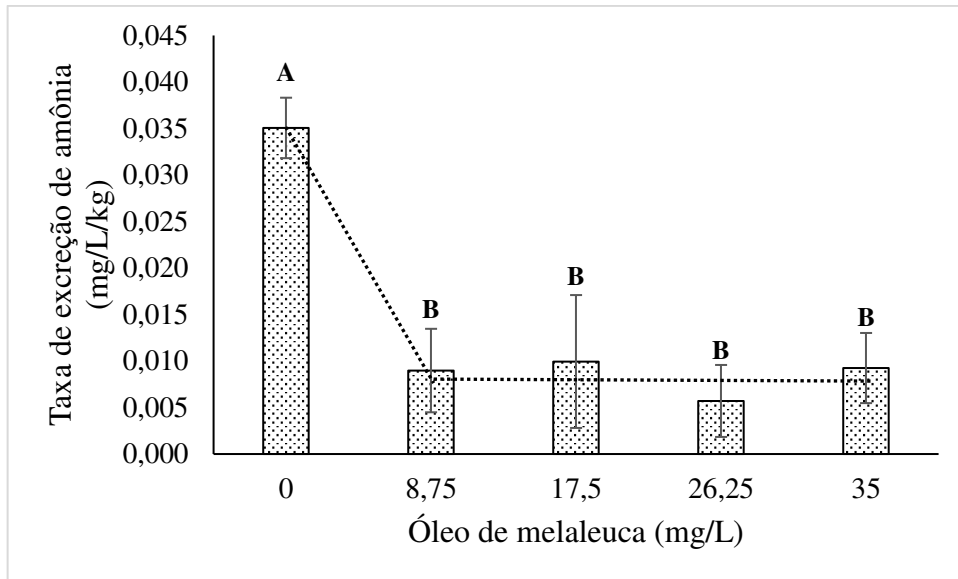


Figura 24. Taxa de excreção de amônia (TAN) de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca na água durante 24h. TAN = $0,035025 - 0,0029771x$; platô = 8,98 mg/L; $R^2 = 0,86$. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00000143$.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de melaleuca sobre a sobrevivência de juvenis de carpas com valores médios (\pm desvio padrão) de $100 \pm 0,0$; $100 \pm 0,0$; $98,33 \pm 3,33$; $100 \pm 0,0$ e $90,83 \pm 18,33$ % respectivamente para os tratamentos 0; 8,75; 17,5; 26,25 e 35 mg/L de óleo de melaleuca (Fig. 25).

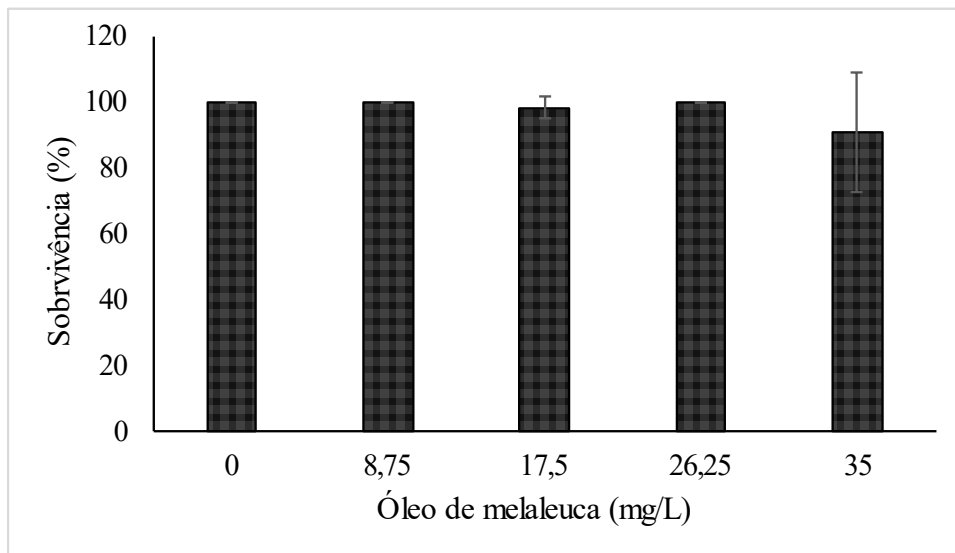


Figure 25. Sobrevivência de juvenis de *C. carpio* após exposição a diferentes concentrações de óleo de melaleuca por 24h.

Para os valores de glicose sanguínea, observamos efeito significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos. O teor de glicose dos tratamentos com 0; 8,75 e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca não diferiram do valor antes do início do experimento ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos 0; 8,75; 17,5; 26,5 mg/L de óleo de melaleuca. Já

o tratamento com 35 mg/L de óleo de melaleuca apresentou maior valor de glicose sanguínea do que todos os demais tratamentos (Fig. 26).

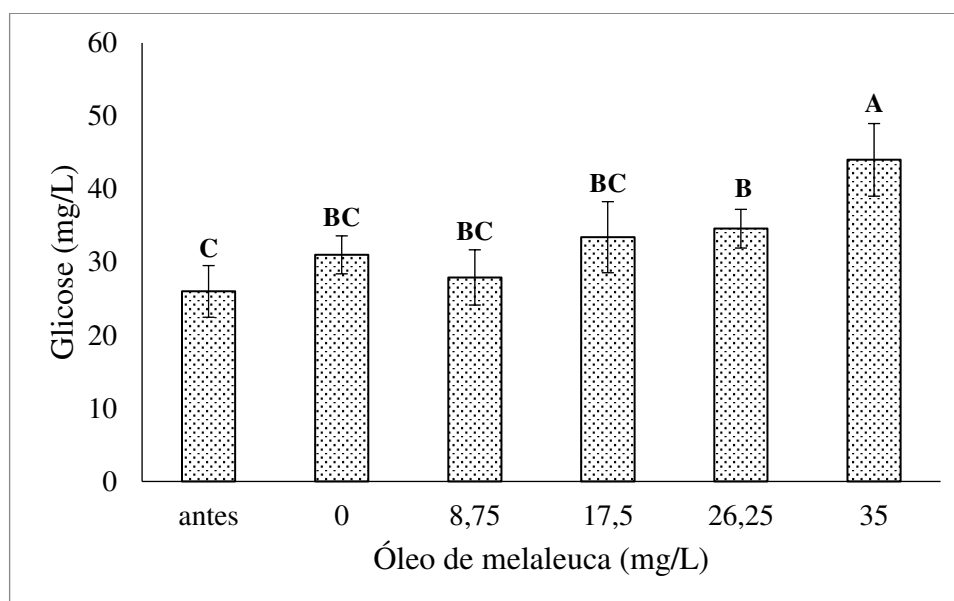


Figura 26. Glicose sanguínea de juvenis de carpa, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações de óleo de melaleuca durante 24h. Diferentes letras representam diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,00003$.

Houve efeito linear decrescente ($p < 0,05$) do óleo de melaleuca sobre o pH da água. A comparação das médias pelo teste Tukey mostrou que os tratamentos 8,75 e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca não diferiram do controle ($p > 0,05$). Já os tratamentos 26,25 e 35 mg/L de óleo de melaleuca apresentaram menores valores de pH do que o controle ($p < 0,05$), porém, não diferiram entre si, bem como não diferiram ($p > 0,05$) dos tratamentos 8,75 e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca (Fig. 27).

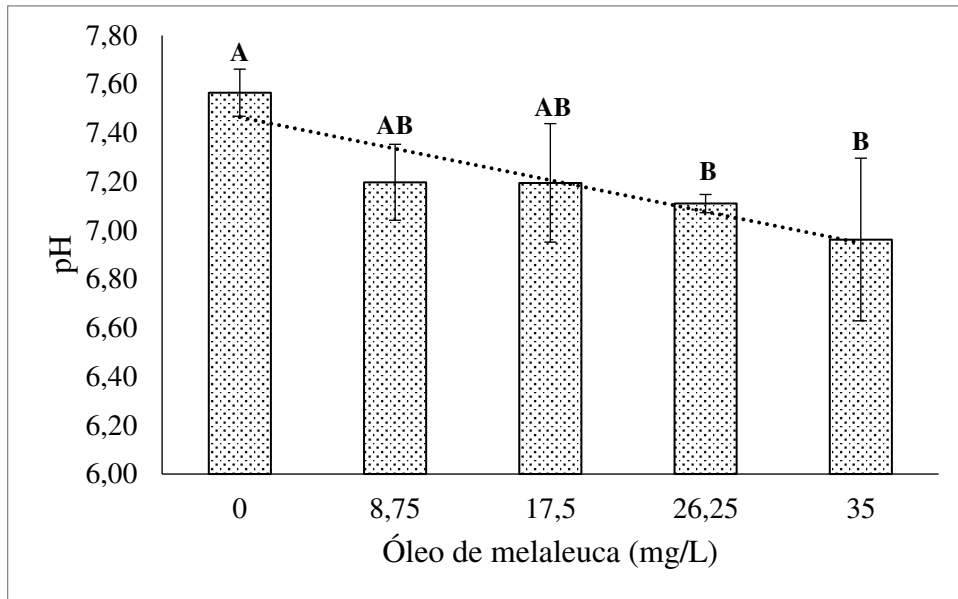


Figura 27. pH na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. $pH = 7.4645 - 0,014771x$; $R^2 = 0,48$. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0107$.

Para o teor de oxigênio dissolvido na água não houve efeito significativo do óleo de melaleuca (Fig. 28).

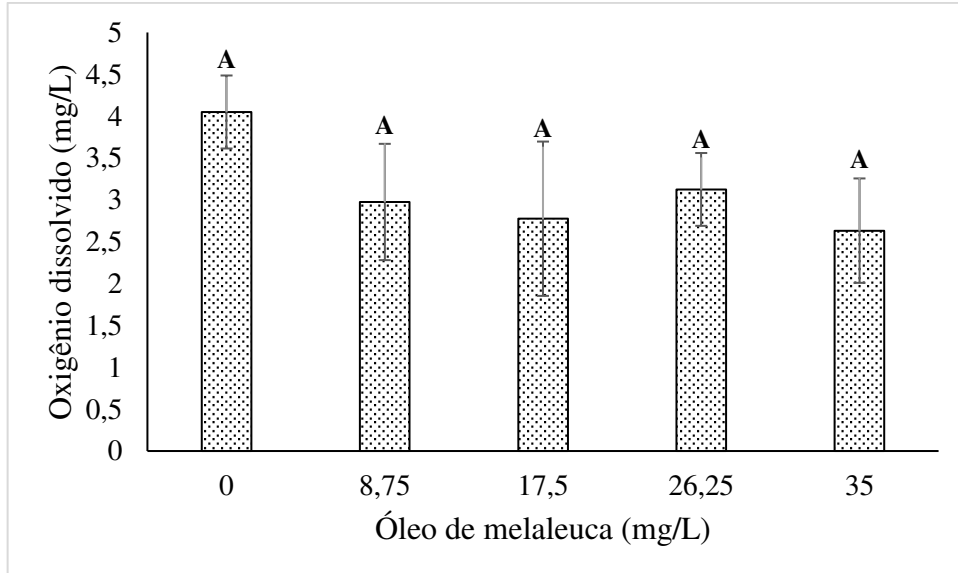


Figura 28. Oxigênio dissolvido (O₂) na água de juvenis de carpas, *C. carpio*, expostos a diferentes concentrações óleo de melaleuca durante 24h. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças entre médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. $p = 0,0549$.

A comparação da porcentagem de redução na excreção de amônia em relação ao tratamento controle para os óleos essenciais avaliados, mostrou que os tratamentos que mais reduziam a excreção de amônia foram 26,25 mg/L de óleo de melaleuca e 15,0 mg/L de óleo

de cravo. Contudo, os tratamentos 11,25 mg/L de óleo de cravo e 8,75; 17,5 e 35,0 mg/L de óleo de melaleuca também apresentam importantes reduções na excreção de amônia (Figs. 29 - 31). Apesar do óleo de orégano ter proporcionado redução na excreção de amônia em todas as concentrações avaliadas, seu maior efeito é menor que a metade dos melhores efeitos observados para os óleos de cravo e orégano.

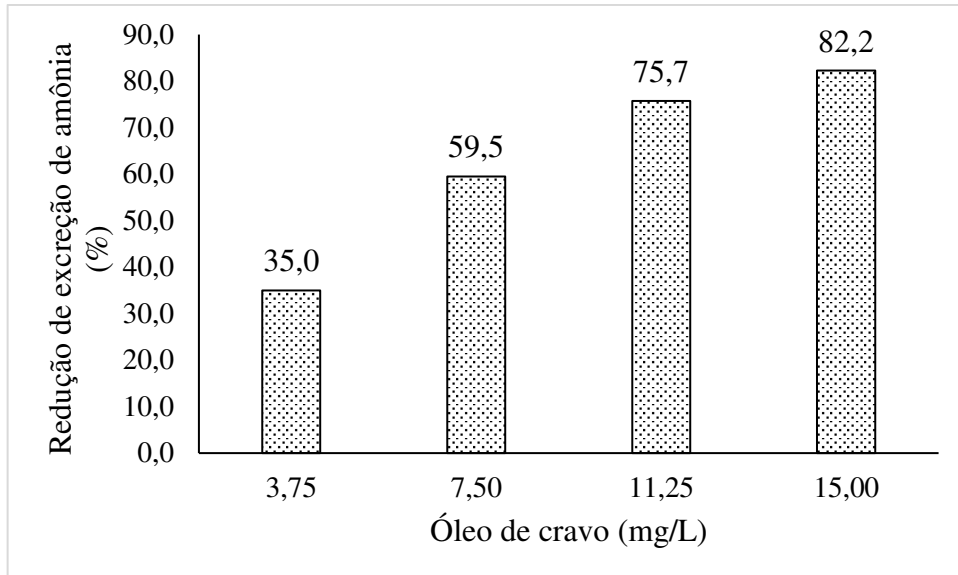


Figura 29. Efeito do óleo de cravo na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle, sem óleos essenciais.

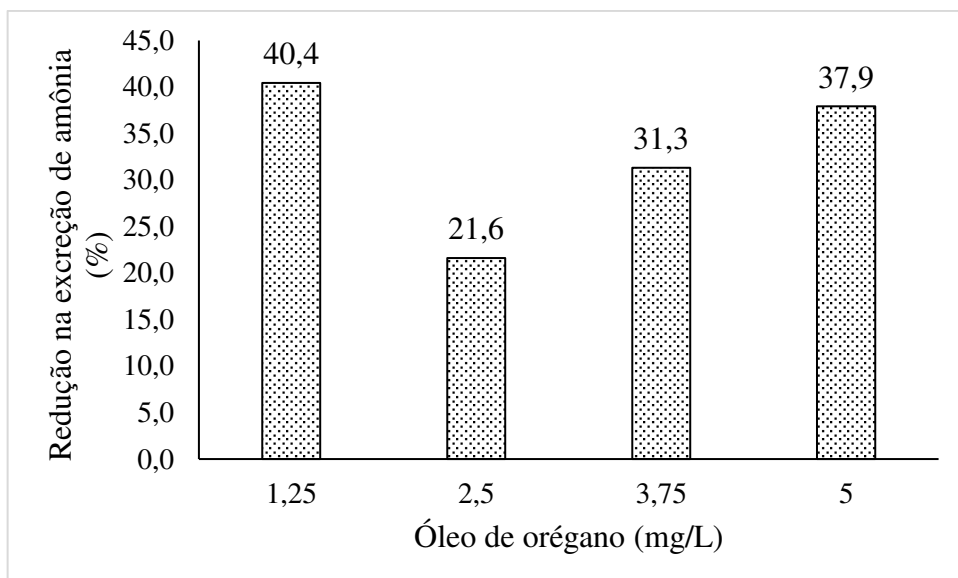


Figura 30. Efeito do óleo de orégano na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle, sem óleos essenciais.

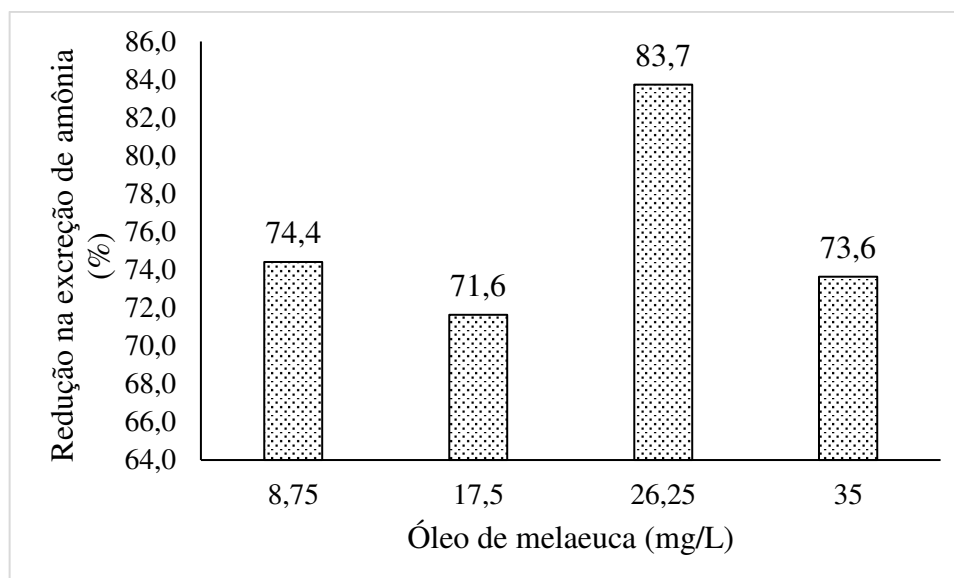


Figura 31. Efeito do óleo de melaleuca na redução de excreção de amônia em relação ao tratamento controle sem óleos essenciais.

4. Discussão

O aumento na excreção de amônia total (AT) e amônia não ionizada (ANI) em função do tempo para todos os óleos essenciais avaliados já era esperado, pois a amônia se acumula na água do aquário, que não teve renovação de água, nem qualquer tipo de filtro que permitisse a conversão de amônia em nitrito e nitrato por bactérias nitrificantes (Martinez et al., 2006). Como a taxa de sobrevivência para a maioria dos tratamentos foi alta, podemos concluir que a amônia não ionizada não atingiu níveis críticos para a espécie, variando de 0,001 a 0,03 mg/L. Abbas (2006) observou que a LC_{50} de NH_3 para juvenis de *C. carpio* foi de 0,93 mg/L, enquanto para Paul & Kaviraj (2002) foi de 0,63 a 1,75 mg/L, e de 1,84 mg/L segundo Hasan & Macintosh (1986).

Para amônia total (AT) e amônia não ionizada (ANI), a dose de óleo de cravo estimada que proporciona a menor excreção de AT foi de 10,24 mg/L e de ANI foi de 11,13 mg/L. Porém, com base no teste Tukey, a dose de 3,75 mg/L de óleo de cravo seria mais indicada por promover a mesma redução na excreção de AT e ANI que as demais doses de óleo de cravo, com menor custo. Para o óleo de orégano, a concentração estimada que proporciona a menor excreção de AT foi de 3,16 mg/L e de ANI de 1,32 mg/L, porém, pelo teste Tukey, a concentração de 1,25 mg/L seria a mais indicada por não diferir das demais doses e ser de menor custo. Os efeitos do óleo de melaleuca mostraram que a concentração estimada que minimiza a excreção de AT foi de 23,45 mg/L e de ANI foi de 8,82 mg/L, mas pelo teste Tukey não houve diferenças

significativas entre as concentrações avaliadas para AT e ANI. Dessa forma, a melhor concentração seria a 8,75 mg/L por não diferir das demais concentrações e ser a de menor custo. Estes resultados mostram que as concentrações que são efetivas na redução da excreção de amônia são bem menores do que as concentrações que provocam anestesia e até mesmo as que causam sedação nos peixes, como observado por Pattanasiri et al. (2017) para o óleo de cravo, Bodur et al. (2018b) para o óleo de orégano e Hajek (2011) para o óleo de melaleuca.

Com base na taxa de excreção de amônia total (TAN), as concentrações estimadas que minimizam a TAN são 3,77 mg/L de óleo de cravo e 8,98 mg/L de óleo de melaleuca, obtidos através da análise de modelo descontínuo (LRP). Para o óleo de orégano, a análise de regressão polinomial mostrou que a maior redução na excreção de amônia ocorreu na concentração de 5 mg/L, porém, pelo teste Tukey, não há diferenças significativas entre as concentrações de óleo de orégano e, portanto, a melhor dose é de 1,25 mg/L por ser a de menor custo. Uma das possibilidades para explicar os efeitos dos óleos essenciais na redução da excreção de amônia seria a diminuição na taxa metabólica pelo efeito sedativo, o que resultaria em menor gasto energético e menor necessidade de gliconeogênese no fígado a partir de aminoácidos, que causa excreção de amônia (Polakof et al., 2012; Randall & Tsui, 2002). Outra possibilidade seria os princípios ativos dos óleos essenciais modularem a expressão e atividade de enzimas envolvidas na formação e redução de amônia como a aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glutamina sintetase (GS) e glutamato desidrogenase (GDH) (Jerez-Cepa et al., 2019; Devi & Kamilya, 2019).

Com relação a segurança do uso dos óleos essenciais para juvenis de *C. carpio*, os resultados de sobrevivência indicam que mesmo as concentrações mais altas dos três óleos são seguras, uma vez que não observamos diferenças significativas entre os controles e as concentrações avaliadas. Apesar de não termos observado diferenças significativas para a taxa de sobrevivência dos peixes submetidos aos três óleos essenciais, uma repetição do tratamento com a maior concentração de óleo de melaleuca (35,0 mg/L) apresentou sobrevivência de 63,33% e, portanto, recomendamos novos estudos para avaliar a segurança do uso desse óleo. Contudo, pelas respostas de estresse (glicemia) apenas as doses mais baixas dos óleos avaliados são consideradas seguras para juvenis de *C. carpio* por não diferirem do tratamento antes do experimento (peixes não estressados). Dessa forma, as concentrações consideradas seguras de óleo de cravo são menores ou iguais a 7,5 mg/L; de óleo de orégano menores ou iguais a 1,25 mg/L; e de óleo de melaleuca menores ou iguais a 17,5 mg/L. Apesar de outros estudos terem apontado que concentrações mais altas do que as observadas no presente estudo são seguras, é preciso levar em consideração o tempo de exposição, pois quanto maior o tempo

de exposição aos anestésicos, maior o risco de redução da taxa de ventilação branquial e morte dos peixes (Marking e Meyer, 1985; Zahl et al, 2009). Husen & Sharma (2015) observaram que a concentração de óleo de cravo necessária para sedação de *C. carpio* foi de 5 – 7,5 µL/L e, para anestesia, de 25 – 75 µL/L, porém o tempo máximo de exposição foi menor que 5 minutos, todavia, os referidos autores não expuseram os peixes a essas concentrações por maior tempo de forma a avaliar sua segurança. Para o óleo de orégano, Bodur et al., (2018a) observaram que a menor concentração necessária para anestesia de *Dicentrarchus labrax* foi de 50 µL/L, durante exposição de cerca de 2 min, contudo, essa concentração causa 100% de mortalidade após exposição por 30 min. Para o óleo de melaleuca, Hajek, (2011) observou que a menor dose necessária para anestesia de *C. carpio* foi de 500 µL/L durante exposição de até 3,15 min, porém, essa concentração causou 100% de mortalidade após 75 min de exposição.

Para óleos essenciais com propriedade sedativa/anestésica esperamos redução do metabolismo e do consumo de oxigênio e da excreção de CO₂, que resulta em aumento no pH da água (Harmon, 2009). Contudo, apesar dos animais apresentarem comportamento típico de peixes sedados nas doses mais altas de óleo de cravo, não observamos diferenças significativas para o teor de oxigênio dissolvido e pH da água. Sendo assim, com base nessas variáveis de qualidade de água, todas as concentrações de óleo de cravo avaliadas podem ser consideradas seguras para juvenis de *C. carpio*. Já para o óleo de orégano, menores concentrações de oxigênio dissolvido nos tratamentos 2,5 e 3,75 mg/L indicam maior consumo de O₂ e, portanto, maior taxa metabólica, o contrário do esperado para animais sedados (Aydin & Barbas, 2020; Becker et al., 2017). Tanto a redução no oxigênio dissolvido, como no pH da água, podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo aumento das respostas de estresse nos peixes submetidos às concentrações mais altas de orégano, como observado no presente estudo e por Bodur et al., (2024) em *Oreochromis niloticus*. A redução do pH da água dos peixes expostos ao óleo de orégano indica maior excreção de CO₂, uma vez que quanto maior o teor de CO₂ na água, maior é o teor de H⁺ como mostra a equação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3^- \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Como o aumento no teor de CO₂ ocorre em função do aumento da taxa metabólica, aumentos nas respostas de estresse ajudam a explicar o efeito do orégano sobre a redução no pH da água. Contudo, os menores valores de oxigênio dissolvido observados na água de juvenis de *C. carpio* expostos ao óleo de orégano (3,43 mg/L) ainda são considerados satisfatórios para a espécie (Lushchak et al., 2005). Desse modo, mesmo com uma pequena redução no teor de oxigênio e no pH da água, todas as concentrações de óleo de orégano podem ser consideradas seguras para juvenis de *C. carpio*. De maneira semelhante, a maior redução observada no pH (de 7,72 no controle

para 7,52 no tratamento com 5,0 mg/L de óleo de orégano) pode ser considerada pequena e de pouco impacto para o bem estar da espécie e, conseqüentemente, com pouca influência na segurança do uso desse óleo para juvenis de *C. carpio*. Para o óleo de melaleuca, apesar de não ter sido observado efeito sobre o oxigênio dissolvido, a redução no pH da água nas doses mais altas (26,25 e 35,0 mg/L) indica maior taxa metabólica, que também pode ser explicada pelas respostas de estresse (glicemia).

Todos os óleos essenciais avaliados foram efetivos na redução da excreção de amônia para juvenis de carpas. Como os experimentos foram realizados de forma independente, não foi possível realizar comparação estatística entre os efeitos dos óleos. Contudo, o cálculo da porcentagem de redução na excreção de amônia para cada óleo em relação ao controle permite inferir que os melhores resultados foram observados para o óleo de melaleuca, seguido do óleo de cravo.

Com base nos resultados de segurança (sobrevivência, glicose sanguínea, pH e oxigênio dissolvido na água) as concentrações máximas possíveis a serem utilizadas para juvenis de *C. carpio* são 7,5 mg/L de óleo de cravo; 1,25 mg/L de óleo de orégano e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca. Contudo, considerando os custos dos óleos, as concentrações indicadas são 3,75 mg/L de óleo de cravo; 1,25 mg/L de óleo de orégano e 8,75 mg/L de óleo de melaleuca, uma vez que os efeitos dessas concentrações não diferiram das mais altas quanto a eficácia na redução da excreção de amônia. Dessa forma, estas são as doses recomendadas a serem avaliadas durante o transporte de juvenis de carpa, onde os animais estão mais expostos a fatores estressores, com maior atividade metabólica, maior excreção de amônia e CO₂ e, portanto, mais suscetíveis à mortalidade (Sampaio & Freire, 2016). Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar concentrações menores que essas para avaliar sua eficácia na redução da excreção de amônia, de forma a reduzir os custos no uso desses aditivos.

5. Conclusões

Todos os três óleos essenciais avaliados são eficazes na redução da excreção de amônia em juvenis de *Cyprinus carpio* nas concentrações máximas avaliadas (15 mg/l de óleo de cravo; 5 mg/L de óleo de orégano e 35 mg/L de óleo de melaleuca). Contudo, são consideradas seguras apenas as concentrações menores ou iguais a 7,5 mg/L de óleo de cravo; 1,25 mg/L de óleo de orégano e 17,5 mg/L de óleo de melaleuca.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brasil) pela concessão de bolsa ao primeiro autor (Código Financeiro 001), à Piscicultura Sol Nascente para doação de peixes, ao Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM - UFV) e ao Laboratório de Química Analítica Aplicada - (LAQUA - UFV) pelo auxílio durante a realização desses experimentos.

6. Referências bibliográficas

- Abbas, H.H. (2006). Acute toxicity of ammonia to common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*) at different pH levels. Pak. J. Biol. Sci. 9, 2215–2221. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2215.2221>.
- Abdelkhalek, N. K., Risha, E., Mohamed, A., Salama, M. F., & Dawood, M. A. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. Fish Shellfish Immunol, 104, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.064>
- Afifi, S. H., Al-Thobaiti, S. & Rasem, B. M. (2000). Multiple exposure of Asian sea bass, (*Lates calcarifer*, Centropomidae) to clove oil: a histopathological study. Assiut Vet Med J, 42(84), 166-174. <https://doi.org/10.21608/AVMJ.2000.180482>
- Ariel, E. (2005). Ornamental fish as trans-boundary vectors of viral diseases. Diseases in Asian Aquaculture V, 103-112.
- Aydin, B., & Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. Aquaculture, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>
- Baldisseroto, B. Becker, G. A. (2014) Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP; UNESP. (253-264) 336p
- Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 306(1-4), 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- Becker, A.G., Luz, R.K., MAttoli, C.C., Nakayama, C.L., De Souza E Silva, W., De Oliveira Paes Leme, F., De Mendonça Mendes, H.C.P., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. (2017). Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? Aquaculture 481, 184–190, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007>
- Bodur, T., Afonso, J. M., Montero, D., & Navarro, A. (2018a). Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus labrax* and *Argyrosomus regius*. Aquaculture, 482, 78-82.
- Bodur, T., León-Bernabeu, S., Navarro, A., Tort, L., Afonso, J. M., and Montero, D. (2018b). Effects of new plant-based anesthetics *Origanum sp.* and *Eucalyptus sp.* oils on stress and welfare parameters in *Dicentrarchus labrax* and their comparison with clove oil. Aquaculture 495, 402–408. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.021
- Bodur, T., Oktavia, I. S., & Sulmartiwi, L. (2024). Effective concentration of herbal anaesthetics *Origanum vulgare* L. oil and its effects on stress parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Medicine and Science, 10(4), e1492. <https://doi.org/10.1002/vms3.1492>
- Bombardeli, R.A., Meurer, F., Syperreck, M.A. (2003). Metabolismo protéico em peixes. Arq. Ciênc. vet. zool. Unipar, 7 (1): 69-79.

- Bona, A. M., Passos, L. S., Coppo, G. C., Boldrini-França, J., De Oliveira Pacheco, C. F., Merçon, J., ... & Gomes, L. D. C. (2024). Enhancing anesthesia and minimizing toxicity: evaluation of clove, Cinnamon, and tea tree essential oils in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01484-6>
- Borotová, P., Galovičová, L., Vukovic, N. L., Vukic, M., Tvrda, E., & Kačániová, M. (2022). Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Plants*, 11(4), 558. <https://doi.org/10.3390/plants11040558>
- Bosman, D. K., Deutz, N. E. P., Maas, M. A. W., Van Eijik, H. M. H., Smit, J. J. H., De Haan, J. G., Chamuleau, R.A. F. M. (1992). Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by in vivo cerebral cortex microdialysis. *J. Neurochem.* 59, 591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09410.x>
- Boyd, C.E. (1996). *Water quality in ponds for aquaculture*. Hatyai: Shrimp Mart. 482p. ISSN 1678-2305
- Bucking, C. (2017). A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. *Journal of Comparative Physiology B*, 187(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1026-9>
- Buege, J.A., Aust, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymology* 52. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Carneiro, P. C. F., & Urbinati, E. C. (2002). Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International*, 10(3), 221-229. <https://doi.org/10.1023/A:1022166411089>
- Cornet, C., Di Donato, V., Terriente, J. (2018). Combining zebrafish and CRISPR/Cas9: towards a more efficient drug discovery pipeline. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 703. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00703>
- Costa, S. M. O., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D. L., Assunção, J. C. C., & Braz-Filho, R. (2002). Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 66-67. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300032>
- Da Cunha, M. A., De Barros, F. M. C., De Oliveira Garcia, L., De Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., ... & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1-4), 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- Devi, A. A., & Kamilya, D. (2019). Efficacy and effects of clove oil and MS-222 on the immune-biochemical responses of juvenile rohu *Labeo rohita*. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/are.13980>
- Dharmaraj, S. & Dhevendaran, K. (2011) Application of microbial carotenoids as a source of colouration and growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v.3, p.137-144. [http://idosi.org/wjfms/wjfms3\(2\)11/10.pdf](http://idosi.org/wjfms/wjfms3(2)11/10.pdf)
- Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J. (2000). Gene expression end-stage failing heart. *Circulation* 101, 33-9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>

- Drăgan, F. E. L. I. C. I. A., Moisa, C. F., Teodorescu, A., Burlou-Nagy, C., Fodor, K. I., Marcu, F. L. O. R. I. N., ... & Teaha, D. I. M. (2022). Evaluating in vitro antibacterial and antioxidant properties of *Origanum vulgare* volatile oil. *Farmacia*, 70(6), 1114-1122. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.6.15>
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. & Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food chemistry*, 112(3), 702-706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020>
- Elliott, W. H. (1953). Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. *J. Biol. Chem.*, 201:661-672. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66223-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66223-4)
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P. & Nogueira, D. A. (2021). ExpDes.pt: Pacote Experimental Design (Portugues). R package version 1.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>
- Ferreira, P.D.M.F., Rocha, J.S., Gomes, J.R., Caldas, D.W., Martins, M.T.S., De Oliveira, J.M., Salaro, A. L. & Zuanon, J. A. S. (2017). *Curcuma longa* supplementation in the diet of *Astyanax aff. bimaculatus* in preparation for transport. *Aquaculture Research*, 48(8), 4524-4532. <https://doi.org/10.1111/are.13277>
- Fujimoto, R. Y., Pereira, D. M., Silva, J. C. S., De Oliveira, L. C. A., Inoue, L. A. K. A., Hamoy, M., De Mello, V. J., Torres, M. F. & Barbas, L. A. L. (2018). Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish physiology and biochemistry*, 44(1), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>
- Gabriel, N. N., Chikwililwa, C., Liswaniso, G. M., Louw, S., & Namwoonde, A. (2022). The effects of eucalyptus *Eucalyptus globulus* and oregano *Origanum vulgare* essential oils on anaesthesia response in a Namibian marine species, silver kob *Argyrosomus inodorus*. *African Journal of Marine Science*, 44(2), 205-213. <https://doi.org/10.2989/1814232X.2022.2055643>
- Griess, P. (1879) Bemerkungen zu de abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber.*12, 426-8. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>
- Guest, T. W., Blaylock, R. B., & Evans, A. N. (2016). Development of a modified cortisol extraction procedure for intermediately sized fish not amenable to whole-body or plasma extraction methods. *Fish physiology and biochemistry*, 42(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0111-4>
- Hajek, G. J. (2011). The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 42, 296-300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02625.x>
- Hajek, G. J., Klyszejko, B. & Dziaman, R. (2006). The anaesthetic effects of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyol Piscat*, 2(36), 93-97. Doi: 10.3750/AIP2006.36.2.01.
- Harmon, T. S., (2009). Methods for reducing stress and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Rev. Aquac.* 1, 58–66. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>
- Hasan, M. R., & Macintosh, D. J. (1986). Acute toxicity of ammonia to common carp fry. *Aquaculture*, 54(1-2), 97-107. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90261-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90261-9)

- Hochachka, P.W.; Guppy, H.E.; Storey, K.B.; Hulbert, W.C. (1978). Metabolic biochemistry of water vs air-breathing fishes: muscle enzymes and ultra structures. *Canadian Journal of Zoology*, v. 56, n. 4, p. 736-750. <https://doi.org/10.1139/z78-103>
- Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F. et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, London, v. 496, n. 7446, p. 498- 503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Husen, M.A., Sharma, S. (2015). Anaesthetics efficacy of MS-222, benzoak® vet, AQUI-S ® and clove oil on common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Int. J. Res. Fish. Aquac.* 5, 104–114.
- Inoue, L. A. K. A., Afonso, L. O. B., Iwama, G. K., & Moraes, G. (2005). Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, 35, 289-295. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>
- Ip, Y. K., & Chew, S. F. (2010). Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in Physiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00134>
- Jerez-Cepa, I., Fernández-Castro, M., Del Santo O'Neill, T. J., Martos-Sitcha, J. A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., & Ruiz-Jarabo, I. (2019). Transport and recovery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) sedated with clove oil and MS-222: Effects on stress axis regulation and intermediary metabolism. *Frontiers in Physiology*, 10, 449698. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00612>
- Khan, F. R., & Alhewairini, S. S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Current Trends in Cancer Management*, 3-18. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81517>
- King, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C. & Berlinsky, D. L. (2005). The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquac Res*, 36(14), 1442-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2005). Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(6), 1319-1330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>
- Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Minana, M.D., Grisolia, S. (1992). Acute ammonia toxicity is mediated by NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296, 67–68.
- Marking L.L., Meyer F.P. (1985) Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10, 2–5.
- Martinez, C. D. R., Azevedo, F. D., & Winkaler, E. U. (2006). Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. *CYRINO, JEP; URBINATI, EC Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 81-95.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Pietrock, M., Heidrich, S., & Steinberg, C. E. (2008). Humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(1), 17.

- 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>
- Moghrovyan, A., Parseghyan, L., Sevoyan, G., Darbinyan, A., Sahakyan, N., Gaboyan, M., ... & Voskanyan, A. (2022). Antinociceptive, anti-inflammatory, and cytotoxic properties of *Origanum vulgare* essential oil, rich with β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide. *Korean J. Pain*, 35, 140-151. DOI:10.3344/kjp.2022.35.2.140
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology*, 29(1), 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Nova, B. G. V., Dos Santos Silva, L., Da Silva Andrade, M., De Santana, A. V. S., Da Silva, L. C. T., Sá, G. C., & Abreu, A. G. (2024). The essential oil of *Melaleuca alternifolia* incorporated into hydrogel induces antimicrobial and anti-inflammatory effects on infected wounds by *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 173, 116389. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116389>
- Obirikorang, K. A., Amisah, S., Fialor, S. C., & Skov, P. V. (2015). Digestibility and postprandial ammonia excretion in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different oilseed by-products. *Aquaculture International*, 23, 1249-1260.
- Paul, J., & Kaviraj, A. (2002). Toxicity of Ammonia from Different Sources to Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Nature Conservation & Landscape Research*, 41(3-4), 179-185. <https://doi.org/10.1080/0003930022000043455>
- Pattanasiri, T., Taparhudee, W. & Suppakul, P. (2017). Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquacult Int.* 25, 163–175 <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0020-2>
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol*, 182(8), 1015-1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>
- Portz, D. E., Woodley, C. M., & Cech, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16(2), 125-170. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.
- Randall, D. J. & Tsui, T. K. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Mar Pollut Bull*, 45(1-12), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- Randall, D. J., & Wright, P. A. (1989). The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. *Canadian Journal of Zoology*, 67(12), 2936-2942. <https://doi.org/10.1139/z89-416>
- Rao, V.L.R., Murthy, C.R.K., Butterworth, R.F. (1992). Glutamatergic synaptic dysfunction in hyperammonoemic syndromes. *Metab. Brain Dis.* 7, 1–20.

Reis, S. M. (2015). Transporte de juvenis de carpa ornamental (koi), *Cyprinus carpio*: efeito do óleo de hortelã e do tempo de jejum. Viçosa: UFV. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7193>>

Saccol, E. M.; Toni, C.; Pês, T. S.; Ourique, G. M.; Gressler, L. T.; Silva, L. V.; Mourão, R. HV.; Oliveira, R. B.; Baldisserotto, B. & Pavanato, M. A. (2017). 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. <https://doi.org/10.1111/are.13034>

Sampaio, F. D. F.; Freire, C. A (2016). An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish Fisheries*, v. 17, p. 1055–1072. <https://doi.org/10.1111/faf.12158>

Singh, A. K. & Lakra, W. S. (2011). Risk and benefit assessment of alien fish species of the aquaculture and aquarium trade into India. *Rev Aquac*, 3(1), 3-18. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01039.x>

Sink, T. D. & Neal, J. W. (2009). Stress response and posttransport survival of hybrid striped bass transported with or without clove oil. *N. Am. J. Aquac.*, 71(3), 267-275. <https://doi.org/10.1577/A08-040.1>

Vanderzwalmen, M., Eaton, L., Mullen, C., Henriquez, F., Carey, P., Snellgrove, D., & Sloman, K. A. (2019). The use of feed and water additives for live fish transport. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 263-278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>

Velisek, J., Stara, A., Li, Z. H., Silovska, S., & Turek, J. (2011). Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture*, 310(3-4), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>

Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J., & Xie, J. (2021). Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. *Animals*, 11(11), 3304. <https://doi.org/10.3390/ani11113304>

Zahl I.H., Kiessling A., Samuelson O.B., Hansen M.K. (2009) Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*)- effect of pre-anaesthetic sedation and importance of body weight, temperature and acute stress. *Aquaculture* 295, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.019>

ANEXO I: Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção (CEUAP).



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 – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 10 de Julho de 2023

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Óleos essenciais como redutores da excreção de amônia em Danio rerio submetidos ao transporte de longa duração**", protocolo nº **033/2023**, 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 apreciado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **18 de Abril de 2023**.

Finalidade: **Pesquisa** **Ensino**

Vigência do Projeto: de **01 de Maio de 2023** a **31 de Março de 2024**

Espécie/linhagem: **Paulistinha (Danio rerio)** Nº de animais: **6400**

Peso: **1,5 gramas** Idade: **4-5 meses** Sexo: - Origem: **Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura Cnpj/CPF: 484.991.966-91** Responsável: **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**

Data de Aprovação: **10 de Julho de 2023**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Essential oils as ammonia excretion reducers in Danio rerio subjected to long-term transport**", protocol nº **033/2023**, 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 **Apr. 18Th of 2023**.

Finality: **Research** **Education**

Duration of the Project: from **May. 1Th of 2023** to **Mar. 31Th of 2024**.

Species / strain: **12:00:00 AM** Nº of animals: **6400**

Weight: **1,5 gramas** Age: **4-5 months** Sex: - Source: **Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura Cnpj/CPF: 484.991.966-91** Responsável: **Jener Alexandre Sampaio Zuanon**

Approval date: **Jul. 10Th of 2023**

Luciana Navajas Rennó

Luciana Navajas Rennó
Coordenadora da CEUAP/UFV