

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**ALEX DA SILVA LOBÃO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E CARACTERIZAÇÃO**  
**ELETROFISIOLÓGICA EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma***  
***macropomum*) SUBMETIDOS À ANESTESIA COM PROPOFOL E ÓLEO**  
**ESSENCIAL DE *Nepeta cataria***

**SÃO CARLOS-SP**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

ALEX DA SILVA LOBÃO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E CARACTERIZAÇÃO**  
**ELETROFISIOLÓGICA EM JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma***  
***macropomum*) SUBMETIDOS À ANESTESIA COM PROPOFOL E ÓLEO**  
**ESSENCIAL DE *Nepeta cataria***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos – SP, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carvalho Peret (UFSCar)

**SÃO CARLOS-SP**

**2018**

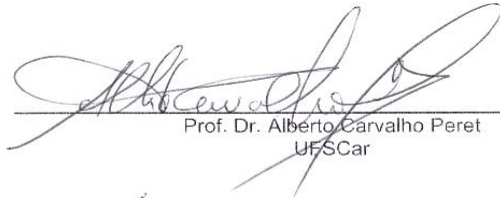


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

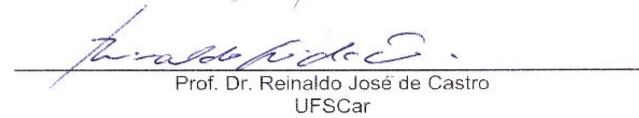
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Alex da Silva Lobão de Souza, realizada em 18/06/2018:



---

Prof. Dr. Alberto Carvalho Peret  
UFSCar



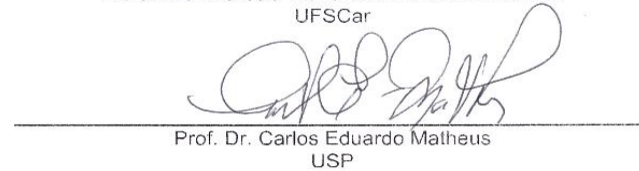
---

Prof. Dr. Reinaldo José de Castro  
UFSCar



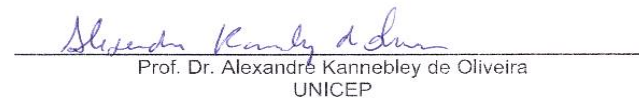
---

Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino  
UFSCar



---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matheus  
USP



---

Prof. Dr. Alexandre Kannebley de Oliveira  
UNICEP

## **AGRADECIMENTOS**

Na tese de doutorado, apesar de ser um processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas. Volto a reiterar tal afirmação, com a certeza de que nunca foi tão verdadeira quanto agora. Desde o início do doutoramento, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, esta investigação não teria sido possível. Ao Professor Doutor Alberto Carvalho Peret, orientador, agradeço o apoio, paciência e partilha do saber, ao professor e amigo Dr. Luís André Luz Barbas (IFPA) que sem sua ajuda seria impossível esta caminhada, ao professor Moisés Hamoy (UFPA) que sempre esteve à disposição e inúmeras vezes compartilhou seu conhecimento e pelas valiosas contribuições para o trabalho e aos estagiários do LAET pela sempre ajuda quando necessários, foram meus braços e mãos durante essa caminhada

As Instituições, inicialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos pela honra em poder cursar um programa de referência nacional que trouxe um gradiente imensurável de conhecimento ao longo desta caminhada; Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Campus Abaetetuba por entender a importância da busca do saber e incentivo ao mesmo; Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Campus Castanhal em especial ao Laboratório de Aquacultura de Espécies Tropicais – LAET e a Universidade Federal do Pará, em especial ao Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais.

Aos amigos que sempre me apoiaram, aos meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos, em especial meus pais Raimundo Aderson Lobão de Souza e Ana Regina da Silva Souza pela força e incentivo nos momentos mais importantes dessa caminhada.

## RESUMO GERAL

Muitos novos fármacos são considerados como novos anestésicos de peixes sem terem comprovação, apesar de estudos comportamentais de indução e recuperação anestésica, apenas o monitoramento dos registros eletrofisiológicos e a verificação da atividade cardiorrespiratória e neuronal poderão determinar sobre a comprovação e o potencial anestésico do agente testado. O estudo foi realizado com juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* através do monitoramento de registros comportamentais e eletrofisiológicos, onde foi observado, registrado e analisado o seu comportamento sob o efeito dos agentes anestésicos, frequência cardíaca, eletrocardiograma, frequência de batimentos (FBO) e intensidade de batimentos operculares (IBO) e eletromiografia, além da sua capacidade antioxidante. Para a determinação da concentração ideal de propofol (PRP) e do óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) foram obtidas através de testes comportamentais onde foram testadas seis concentrações de PRP e OEN de acordo com avaliações preliminares para a definição de faixas-teste, a concentração escolhida foi a capaz de provocar sedação completa em tempo aproximado de 3 min e recuperação em tempo aproximado de 5 min, para tais testes foram utilizados dez animais ( $n = 10$ ) e registrados os tempos de decorrentes para cada estágio de sedação e recuperação pós anestesia, onde foi alcançado a concentração ideal de  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  para EON e  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  para o PRP. Para avaliação eletromiográfica, dados eletrocardiográficos, intensidade de batimentos operculares (OBI) e taxa (OBR), peixes ( $5,6 \pm 1,8\text{g}$ ,  $8,0 \pm 0,3\text{cm}$ , comprimento total) foram atribuídos aos seguintes grupos: a) controle (registro basal b) peixes expostos ao etanol (veículo controle), c) peixes submetidos à indução com EON a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  e posterior recuperação e d) peixes submetidos à indução com PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  e posterior recuperação. Oito peixes ( $n = 8$ ) por grupo foram utilizados. Ambos os produtos induziram a imobilização completa do corpo e suprimiram o poder de contração do músculo dorsal (99,9%), determinando um estado semelhante à anestesia geral. Durante a exposição a qualquer um dos anestésicos, a função cardíaca foi afetada transitoriamente, com diminuição da frequência cardíaca (42 - 43%) e discreta arritmia nos peixes em recuperação do PRP. Além disso, a capacidade ventilatória foi reduzida com este medicamento (85,3% e 59,6% de redução no OBI e no OBR, respectivamente), porém sem mortalidade. Por outro lado, a EON não alterou os traçados do ECG, permitindo a manutenção da intensidade de ventilação

normal durante a exposição, embora tenha ocorrido um discreto incremento na OBR durante a anestesia profunda. Este estudo confirma a anestesia com propofol em peixes e apresenta o óleo essencial de *Nepeta cataria* como anestésico natural novo e seguro para juvenis de *Colossoma macropomum* e potencialmente para outras espécies de teleósteos.

## GENERAL ABSTRACT

The new drugs are new like unproven fish anesthetics, although they have behaviors of induction and anesthetic recovery, only the monitoring of the electrophysiological results and the verification of the cardiorespiratory and neuronal activity of power over the confirmation and the anesthetic potential of the agent tested. The study was carried out with tambaqui juveniles, *Colossoma macropomum* through the monitoring of behavioral and electrophysiological occurrences, where its efficacy under the effect of anesthetic agents, cardiac support, electrocardiogram, heartbeat (FBO) and intensity of opercular beats (IBO) and electromyography, in addition to its antioxidant capacity. Incredible catary (ENP) and the essential of propofol (PRP) and the oil in which were tested from tests that were tested six PRP and OEN for agreement with preliminaries for the definition of tracks-test, a was able to provoke the sedimentation capacity in approximately 3 min and recovery in approximately 5 min for these tests were used in animals (n = 10) and the test times for each stage of sedation and anesthesia recovery, where a concentration ideal of 175  $\mu\text{L L}^{-1}$  for EON and 4  $\mu\text{L L}^{-1}$  for PRP. For electromyographic evaluation, electrocardiographic data, intensity of operative beats (OBI) and rate (OBR), fish ( $5.6 \pm 1.8\text{g}$ ,  $8.0 \pm 0.3\text{cm}$ , total length) were attributed to the following groups: a) control (baseline b) fish exposed to ethanol (control vehicle), c) fish submitted to induction with 175  $\mu\text{L L}^{-1}$  EON and subsequent recovery and d) fish submitted to induction with PRP at 4  $\mu\text{L L}^{-1}$  and subsequent recovery. Eight fish (n = 8) per group were used. Both products induced complete immobilization of the body and suppressed the contraction power of the dorsal muscle (99.9%), determining a state similar to general anesthesia. During exposure to any of the anesthetics, cardiac function was affected transiently, with decreased heart rate (42 - 43%) and mild arrhythmia in fish in PRP recovery. In addition, ventilatory capacity was reduced with this drug (85.3% and 59.6% reduction in OBI and OBR, respectively), but without mortality. On the other hand, EON did not alter ECG tracings, permitting maintenance of normal ventilation intensity during exposure, although a slight increase in OBR during deep anesthesia occurred. This study confirms the anesthesia with propofol in fish and presents the essential oil of *Nepeta cataria* as a new and safe natural anesthetic for juveniles of *Colossoma macropomum* and potentially for other species of teleosts.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Aquicultura no mundo e no Brasil.....	9
1.2. Tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> .....	9
1.3. Anestésicos no manejo de peixes .....	10
1.4. Registros eletrofisiológicos .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. HIPÓTESES .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Animais experimentais e período de aclimação .....	17
4.2. Avaliação das latências para anestesia e recuperação. ....	18
4.3. Marcadores de eletrofisiologia .....	19
4.3.1. REGISTROS ELETROMIOGRÁFICOS (EMG).....	19
4.3.2. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC).....	20
4.3.3. FREQUÊNCIA DE BATIMENTO OPERCULAR (FBO) E INTENSIDADE DE BATIMENTOS OPERCULARES (IBO) .....	20
4.3.4. GRAVAÇÃO E ANÁLISE DOS REGISTROS .....	20
4.4. Análise Estatística .....	21
5. RESULTADOS .....	22
5.1. Análise Comportamental .....	22
5.2. Caracterização Eletrofisiológica.....	24
5.2.1. ELETROMIOGRAFIA (EMG).....	25
5.2.2. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC).....	30
5.2.3. INTENSIDADE DE BATIMENTOS OPERCULARES (IBO) E FREQUÊNCIA DE BATIMENTO OPERCULAR (FBO) .....	32
6. DISCUSSÃO .....	38
6.1. Análise Comportamental .....	38
6.2. Caracterização Eletrofisiológica.....	39
7. CONCLUSÕES .....	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aquicultura no mundo e no Brasil

A produção de pescados oriundos de atividades aquícolas alcançou em 2014 o número de 73,8 milhões de toneladas, tendo um crescimento anual de 5,8% na última década, sendo uma das atividades agropecuárias de maior crescimento no globo. A América Latina produziu cerca de 3,74% deste total com uma produção de 2,75 milhões de toneladas (FAO, 2016).

O Brasil é considerado um dos países com maior potencial para a difusão da atividade aquícola, possuindo 13,7% de toda água doce disponível no planeta, mais de 5 milhões de hectares de águas represadas em reservatórios e hidrelétricas, 8.500 Km de linha de costa, 2,5 milhões de hectares de áreas estuarinas e 600.000 hectares de áreas propícias para a carcinicultura, com 4,5 milhões de Km<sup>2</sup> de Zona Econômica Exclusiva (ZEE) para o desenvolvimento da pesca extrativista e da maricultura, sem mencionar que o país apresenta uma das maiores produções de grãos do mundo (FAO, 2016).

Com uma produção aquícola superior a 562 mil toneladas (FAO, 2016), a piscicultura continental tem sido a de maior destaque com 70,2% da produção total nacional (IBGE, 2014). A região amazônica detém 68% de toda área hídrica superficial do país (ANA, 2014) e contribui com 45,7% da produção aquícola continental nacional. Atualmente, utilizam-se na piscicultura comercial mais de 30 espécies, com os mais variados hábitos alimentares e provenientes de distintos ambientes (SCORVO-FILHO, 2003).

Um dos principais requisitos para o bom desenvolvimento da atividade aquícola é o conhecimento adequado da biologia das espécies de interesse para o cultivo. A compreensão da fisiologia, do funcionamento dos sistemas orgânicos, suas interações e respostas permitem o estabelecimento de melhores condições de cultivo das espécies-alvo (SILVEIRA et al., 2009).

## 1.2. Tambaqui, *Colossoma macropomum*

O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1816) é a segunda espécie mais cultivada no Brasil com uma produção de 139.209 toneladas (IBAMA, 2014), sendo distribuída especialmente nas regiões norte, nordeste e centro-oeste, possuindo grande destaque na América latina. Seu crescimento na Amazônia ocorreu devido a implementação do Programa de Desenvolvimento da Aquicultura pelo governo do Amazonas na década de 80, sendo que a partir daí a produção do tambaqui tem crescido

e se expandido em todos os estados da região norte (JUNIOR, 2009), tornando-se a segunda espécie mais cultivada no país (IBAMA, 2014).

O tambaqui é uma espécie nativa do rio Amazonas, Orinoco e seus afluentes, sendo comum em lagos de várzea (SANTOS et al., 2016; FISCHER, 2004; FERNANDES et al., 2010; DAIRIKI e SILVA, 2011; BALDISSEROTTO, 2009). Na Bolívia e no Equador, o tambaqui é conhecido como “pacu”; no Peru, como “gamitana”; na Colômbia e na Venezuela é chamado de “cachama” e “cachama negra”; e nos Estados Unidos, a espécie é denominada de “black pacu”, podendo atingir mais de um metro de comprimento e pesar até 30 kg (RUFFINO, 2005 e SANTOS et al., 2016).

É uma espécie de hábito alimentar onívoro com tendência a herbívoro, filtrador e frutívoro (NUNES et al., 2006; SILVA et al., 2007). Na fase larval com menos de 1 cm de comprimento padrão, as algas são importantes na sua dieta, enquanto que na fase juvenil, a sua alimentação consiste de frutos, sementes e zooplâncton. Já na fase adulta a dieta consiste inteiramente de frutos e sementes (FREEMAN, 1995), possuindo preferência pela ingestão do fruto das seringueiras, *Hevea* spp. (Euphorbiaceae).

A espécie apresenta índices zootécnicos satisfatórios quando em cativeiro, possui um pacote tecnológico de criação relativamente bem definido, apresenta disponibilidade de juvenis, dispõe de ração adequadamente formulada e apresenta viabilidade econômica para criação. É uma espécie bastante rústica e resistente a doenças, com alta tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido e altas de taxas nitrito na água, adaptando-se bem à temperaturas entre 26 e 35 °C (MELO, 2001 e KUBITZA, 2012), possui um rendimento de carne de 63% (CARTONILHO e JESUS, 2011) e a rentabilidade da criação, segundo Melo et al. (2001) e Souza et al. (2014) varia de 19 a 40%.

### **1.3. Anestésicos no manejo de peixes**

A palavra “anestesia” deriva do grego antigo *an* (ausência) + *aisthesis* (sensação), que significa “ausência de sensações”. A anestesia é um processo reversível que provoca perda de sensação de todo ou em parte do corpo e que resulta em depressão da função nervosa, causada por um fármaco (WILLIAMS e WILKINS COMPANY, 1982).

Os anestésicos são agentes químicos ou físicos, que com o aumento da exposição ou concentração, primeiro acalmam (sedam) um animal e depois causam perda de mobilidade, equilíbrio, consciência e finalmente das reações reflexas (COYLE

et al., 2004), por evitarem o início e condução do impulso nervoso (SUMMERFELT e SMITH, 1990).

A anestesia geral em peixes foi descrita inicialmente por McFarland em 1960. Em 1969, McFarland e Klontz (THURMON et al., 1996) fizeram uma nova classificação da anestesia geral em peixes. Espera-se que a maioria dos peixes submetidos à indução anestésica passe por todas as fases de anestesia, entretanto, podem ocorrer variações nas diferentes espécies, em função do tipo de anestésico empregado e da dose aplicada (DELBON, 2006). Algumas dessas fases podem não ocorrer, ou de outra forma, ocorrerem de forma muito rápida, sendo visualmente imperceptíveis no processo de indução anestésica de certos peixes (BROWN, 1993).

Os anestésicos podem ser injetáveis, embora a maioria seja administrada na água (BOWSER, 2001; ROUBACH e GOMES, 2001). Quando utilizado na forma de banho, o anestésico entra através das brânquias e da pele no sistema circulatório, bloqueando algumas ações reflexas (SUMMERFELT e SMITH, 1990). Segundo Ross e Ross (2008), após a absorção branquial, suas moléculas se difundem rapidamente para a corrente sanguínea na lamela secundária, que drena para o sangue da artéria eferente, sendo esta uma rota curta para o sistema nervoso central.

A escolha de um anestésico deve ser baseada em vários aspectos como: valor do produto, eficácia (deve ser um produto de fácil e rápida indução e imobilização e com rápida e calma recuperação), disponibilidade no mercado e facilidade de obtenção. Deverá ser atóxico, de fácil administração, seguro durante a utilização e que não acarrete efeitos colaterais aos peixes, ao manipulador e ao meio ambiente (GILDERHUS e MARKING, 1987; BURKA *et al.*, 1997; ROSS e ROSS, 2008).

A eficácia anestésica também pode ser condicionada pelas características físico-químicas da água (ex: temperatura, pH, salinidade e outros) e fatores biológicos (ex: tamanho, peso, relação entre área branquial e corporal, além de variações na taxa metabólica e teor de lípidos) e ainda em função das diferentes espécies (SUMMERFELT e SMITH, 1990; BURKA et al., 1997; ROUBACH e GOMES, 2001; COYLE et al., 2004; ROSS e ROSS, 2008).

Em geral, a indução anestésica deve ser rápida e com baixa ou nenhuma hiperatividade. Durante a indução o animal frequentemente apresenta uma sucessão de sinais, como perda do movimento ou ataxia, perda de reflexo, incapacidade de se manter na posição reta na coluna d'água e, posteriormente a estes eventos, ocorre a anestesia profunda, sem que haja reação a qualquer estímulo externo visual ou mecânico (ROSS e

ROSS, 2008). Recomenda-se que a indução à anestesia profunda ocorra em um tempo médio de três minutos, enquanto que a recuperação deverá ocorrer rapidamente, em tempos inferiores a cinco minutos (MARKING e MEYER, 1985). Para Coyle et al. (2004), a indução inicial pode levar de alguns segundos a vários minutos e a completa recuperação pode ocorrer de minutos a horas, ambas dependendo do anestésico administrado, suas concentrações e da espécie utilizada. Gilderhus & Marking (1987), Son et al. (2001) e Park et al. (2003) consideram 10 minutos como sendo o limite máximo ideal para o tempo de recuperação.

Uma série de substâncias químicas revelaram-se eficazes na anestesia de peixes (VELÍŠEK et al., 2006). Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são a tricaina metanossulfonato (MS-222) e o 2 - fenoxietanol (PE) (SVOBODA e KOLAROVA, 1999), além do etanol, éter dietílico, benzodiazepinas, halotano, lidocaína, cetamina, medetomidina, propofol e o dióxido de carbono (NEIFFER e STAMPER, 2009; WEBER III, 2011). Outros estudos têm avaliado a eficácia anestésica da benzocaína (etil aminobenzoato) que também tem sido utilizada com frequência em diferentes espécies de teleósteos (HEO e SHIN, 2010; PRAMOD et al., 2010), no entanto tais produtos podem apresentar preços proibitivos e efeitos adversos, como irritabilidade aos animais e outros efeitos indesejáveis aos manuseadores (ROUBACH & GOMES, 2001).

Um anestésico bastante utilizado em mamíferos é o propofol (2,6-diisopropilfenol), que é um fármaco de ultracurta-duração da classe dos anestésicos parenterais. Ele potencializa a ação inibitória central do ácido gama-amino-butírico (GABA) em seu receptor tipo A, bloqueia o canal iônico no tecido cortical cerebral e nos receptores nicotínicos centrais e exerce efeito inibitório sobre a sinalização intracelular em receptores de mediadores lipídicos. O propofol é um composto químico relativamente insolúvel em água. É comercializado a 1% ou 2% em emulsão leitosa branca contendo óleo de soja em 10%, 2,25% de glicerol e 1,2% de fosfato de ovos purificados. É comumente utilizado em seres humanos para indução anestésica em pacientes adultos e pediátricos (com mais de 3 anos de idade), manutenção da anestesia geral em pacientes adultos e pediátricos (com mais de 2 meses de idade) e sedação para procedimentos médicos menos invasivos.

Existem também extrativos provenientes de fontes naturais como óleos essenciais de plantas, que apresentam vasto potencial para utilização como anestésicos na aquicultura como: o óleo de cravo, que tem por principal componente ativo (70% a

90%) o eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil) fenol], tendo sido investigado em diversos estudos e qualificando-se como um produto natural eficiente para indução anestésica a um bom custo-benefício (WALSH & PEASE, 2002; IVERSEN et al., 2003; KING et al., 2005; MYLONAS et al., 2005; ROUBACH et al., 2005; CUNHA & ROSA, 2006; HAJEK et al., 2006; BARBOSA et al., 2007); o mentol, que foi utilizado para anestésiar juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, mostrando-se também um eficiente anestésico (GONÇALVES, et al., 2008). Os óleos essenciais das plantas erva cidreira *Lippia alba* e a alfavaca *Ocimum gratissimum* também foram testados em jundiá, *Rhamdia quelen*, mostrando-se efetivos e seguros para essa espécie. O óleo essencial de *L. Alba* amenizou inclusive o estresse oxidativo em experimentos de transporte simulado (CUNHA et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2011; SILVA et al., 2012). A planta *Aloysia triphylla*, foi testada no camarão *Litopenaeus vannamei*, revelando-se eficaz na indução anestésica em plano mais profundo e em concentrações mais baixas para obtenção de sedação mais superficial em experimentos de transporte simulado (PARODI et al., 2012). O extrato ceroso de jambu, *S. acmella*, também conhecido como agrião-do-Pará apresentou grande poder sedativo/anestésico em tambaqui apresentando também potencial como antioxidante (BARBAS et al., 2017). O óleo essencial de canela-amarela *Nectandra grandiflora* também foi testado como agentes sedativos e antioxidantes em juvenis de tambaqui mostrando resultados promissores (BARBAS et al., 2017).

A *Nepeta Cataria* é uma planta pertencente à família Lamiaceae, sendo uma erva perene cujas folhas são suculentas e com leve odor de menta. É encontrada nas regiões centrais e no sudeste Europeu, em regiões selvagens dos Estados Unidos, sul do Canadá, sul da África e na região central do sudeste Asiático. São usadas na medicina popular (SMITHERMAN et al., 2005) por conta de seus efeitos antisépticos, adstringente, antitussígenos, anti-espasmódicos, antiasmáticos, anti-térmicos, diuréticos e analgésicos (SMITHERMAN et al., 2005; MICELLI et al., 2005; AYDIN et al., 1998; OSTERHOUDT et al., 1997). Apresentam um grande potencial antinociceptivo (RICCHI, 2006) e sedativo (MAIRESSE, 1981; HART et al., 1985; OSTERHOUDT et al., 1997; SHERRY et al., 1978; JACKSON et al., 1969). Estudos demonstraram efeitos alucinógenos em gatos e camundongos o que deu origem aos nomes populares de “catnip”, “catswort” e “catmint”. No Brasil é conhecida como erva-gateira ou erva-dos-gatos (BERNARDI et al., 1994; MASSOCO et al., 1991; HATCH et al., 1972; PALEN et al., 1966)

#### **1.4. Registros eletrofisiológicos**

Ao longo da evolução os organismos adquiriram a capacidade de enviar e processar informações com uma alta taxa de velocidade de transmissão, a qual não era possível até então com o uso apenas do fluxo sanguíneo e de moléculas sinalizadoras como os hormônios. Tal fenômeno biológico se permitiu através de manifestações elétricas celulares, dessa forma, o sistema nervoso tornou-se altamente especializado na rápida e eficiente transmissão de impulsos nervosos através de potenciais elétricos gerados em suas membranas celulares (RIBEIRO, 2013).

Estes potenciais elétricos criados a partir da movimentação de íons através das membranas dos neurônios surgiram como células excitáveis e componentes fundamentais dos tecidos nervosos, glandulares e musculares. Em repouso, estas células vivas apresentam diferença de potencial elétrico de várias dezenas de milivolts através da membrana plasmática, com o meio intracelular negativo em relação aos líquidos extracelulares (LEC) (DELATTRE, 2007), ou seja, a membrana celular se abre toda vez que a célula muda seu potencial de repouso, invertendo sua polaridade momentaneamente, levando ao surgimento de um potencial de ação que pode se propagar por longas distâncias e transmitir o estímulo para células vizinhas que sejam capazes de se excitar na presença desse tipo de estímulo. A gênese desse potencial de membrana está associada a mecanismos de transporte de íons, que criam um meio iônico intracelular de composição distinta daquela do meio iônico extracelular, sendo estes sinais elétricos gerados por células especializadas em diversos órgãos como cérebro e músculos por exemplo (RIBEIRO, 2013).

Nesse particular, os processos de difusão (potenciais de difusão) e os transportes ativos (potenciais de bombas eletrogênicas) representam os mecanismos básicos responsáveis pela polarização da membrana plasmática. A difusão de íons a favor de gradientes de concentração é a mais importante causa de manifestação elétrica em sistemas biológicos (DELATTRE, 2007).

O registro das variações de potencial elétrico produzidas pelos neurônios do cérebro é chamado de eletroencefalograma (EEG), termo que foi introduzido pelo psiquiatra alemão Hans Berger, pesquisador que fez os primeiros registros elétricos de EEG humano em 1929. O EEG é um exame que analisa a atividade elétrica cerebral espontânea, captada através da utilização de eletrodos. O objetivo desse exame é obter registro da atividade elétrica cerebral para o diagnóstico de eventuais anormalidades dessa atividade. O EEG mede as flutuações de tensão resultante da corrente iônica

dentro dos neurônios do cérebro. Dentro de contextos clínicos, a EEG refere-se à gravação da atividade elétrica espontânea do cérebro durante um período de tempo, como a registrada a partir de múltiplos eletrodos.

A atividade elétrica cerebral, como já mencionado, é espontânea e contínua, podendo ser evidenciada durante a vigília, o sono, a anestesia e o coma, cessando apenas nos estados extremos de anóxia cerebral (PINTO, 2006). Essa atividade elétrica compõe um conjunto de muitos traçados irregulares simultâneos, indicando alterações de voltagem entre pares de eletrodos e é caracterizada por amplitudes extremamente pequenas (da ordem de microvolts). Os ritmos do eletroencefalograma variam consideravelmente e correlacionam-se frequentemente com determinados estados do comportamento (com os níveis de atenção, sono e vigília) e com patologias (como crises epiléticas ou coma) (RIBEIRO, 2013). Os ritmos são categorizados pela sua faixa de frequência, e cada faixa é denominada utilizando-se uma letra grega. O EEG pode apresentar, então, os seguintes ritmos (BEAR, 2008):

- Gama: são os mais rápidos, maiores que 30 Hz;
- Beta: ritmos rápidos de 14 a 30 Hz, e sinalizam um córtex ativado;
- Alfa: entre 8 e 13 Hz e estão associados a estados de vigília, em calmo repouso;
- Teta: entre 4 e 7 Hz e ocorrem durante alguns estados do sono;
- Delta: menores que 4 Hz, são muito lentos, grandes em amplitude e indicam sono profundo

A Eletromiografia (EMG) é o estudo da detecção, registro, análise e uso do sinal elétrico proveniente da contração muscular (WEBSTER, 1988). Essa técnica pode ser realizada com duas metodologias, a eletromiografia de superfície e a de profundidade. A eletromiografia de superfície compreende a captação do sinal mioelétrico utilizando eletrodos dispostos na superfície da pele, enquanto a eletromiografia de profundidade constitui uma técnica invasiva, na qual eletrodos, do tipo agulha ou fio, são introduzidos diretamente em um determinado músculo (WEBSTER, 1978; RIBEIRO, 2013).

No EMG de superfície, o sinal coletado compreende a atividade de diferentes UMs (Unidades Motoras), não sendo possível o isolamento para a observação da atividade de uma única unidade motora. Já a eletromiografia de profundidade permite que se observe apenas uma única UM, por meio da introdução de eletrodos diretamente nas fibras musculares (ROSA, 2005).

Outro registro eletrofisiológico de importância é o Eletrocardiograma (ECG), que consiste na “gravação” dos impulsos elétricos que são gerados enquanto o coração

está em contração. Para que as fibras cardíacas se contraíam é necessário que haja o estímulo às fibras, ou seja, o potencial de ação, que se propaga pelas fibras podendo ser detectado na superfície da pele por eletrodos (GUIMARÃES, et al., 2003). O ECG representa a soma dos potenciais de ação do coração que emanam sobre a superfície do corpo. Estudos de monitoramento de ECG em peixes são escassos. A caracterização do ECG é fundamental importância, pois esse registro demonstra a ação das drogas anestésicas sobre a atividade elétrica cardíaca, possibilitando o acompanhamento das alterações funcionais durante a indução, manutenção e o retorno anestésico, isso ocorre pela ação direta nos vasos ou no coração, seja por modulação da neurotransmissão ou diretamente no tecido.

É válido afirmar que somente o monitoramento da atividade neuronal no sistema nervoso central é capaz de provar anestesia geral com perda de consciência, o que em última instância determinará se uma substância é ou não considerada anestésica.

Apesar do número de produtos disponíveis ainda relativamente restrito, os anestésicos vêm sendo utilizados de forma cada vez mais rotineira na aquicultura intensiva, no intuito de facilitar o manuseio em diversas situações onde houver necessidade de manipulação dos animais, como em biometrias periódicas, na marcação de animais, no transporte, na reprodução artificial e em procedimentos cirúrgicos (COYLE et al., 2004; ROUBACH et al., 2005; WEBER et al., 2009).

Além da inquestionável importância dos produtos anestésicos para auxílio à piscicultura, aumento da sobrevivência e incremento da produtividade, a necessidade da utilização de anestésicos para peixes diz respeito a uma questão ética, onde a supressão da dor, do desconforto, do sofrimento e a promoção de bem-estar animal são questões relevantes a serem consideradas e cada vez mais observadas pela sociedade moderna (SNEDDON, 2012). Nesse contexto, o estudo de novos agentes anestésicos poderá propor o uso de fármacos alternativos para essa finalidade, que sejam eficazes, potencialmente menos onerosos, sem prescindir da segurança e eficácia necessárias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar a eficácia anestésica do propofol (PRP) e do óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* através de ensaios de concentração-resposta, seus efeitos sobre os parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos.



## **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar as latências para anestesia rápida e profunda e a recuperação em juvenis de *C. macropomum* submetidos a banhos anestésicos com PRP e OEN;
- Caracterizar a extensão do miorelaxamento obtido através da análise do eletromiograma, além de avaliar os impactos sobre a função cardiorrespiratória através dos registros de eletrocardiograma, frequência cardíaca e intensidade e frequência dos batimentos operculares de juvenis de *C. macropomum* expostos a banhos de curta duração com o PRP e OEN;

## **3. HIPÓTESES**

- Concentrações anestésicas do propofol (PRP) e o óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) proporcionam relaxamento muscular significativo, sem que ocorra comprometimento da função cardiorrespiratória.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais experimentais e período de aclimação**

Os indivíduos utilizados foram tambaquis, *Colossoma macropomum*, adquiridos de fazenda comercial e provenientes de desova induzida. Os animais foram estocados em aquários no Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA) em ambiente com temperatura controlada (25 a 28 °C) e fotoperíodo 12 h C: 12 h E. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com ração comercial (32% de proteína) até à saciedade. Concomitantemente à sifonagem diária para a retirada de alimento não consumido e fezes, a água foi parcialmente renovada (aproximadamente 20% do volume dos tanques) com água de mesma origem. Durante a aclimação (30 dias), parâmetros de qualidade de água foram monitorados e controlados, a temperatura da água (°C), potencial hidrogeniônico (pH); oxigênio dissolvido (OD) foram mensurados com auxílio de sonda multiparâmetro HANNA modelo HI9828, já a amônia (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) foi determinada seguindo recomendações de Unesco (1983) e a dureza total foi analisada por titulação de acordo com diretrizes de Adad (1982). Os valores encontrados e

mantidos foram: Temp 26,8 °C; pH 7,5; OD > 5,0 mg/l; NH<sub>3</sub><sup>+</sup> < 0,1 mg/l e Dureza Total 70 mg/l de CaCO<sub>3</sub>

#### **4.2. Avaliação das latências para anestesia e recuperação.**

O propofol (PRP) foi adquirido de estabelecimento comercial (Claris Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda), na apresentação de 2%, em emulsão leitosa branca contendo óleo de soja a 10%, glicerol a 2,25% e 1,2% de fosfato de ovos purificados. O óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) também foi obtido de estabelecimento comercial (Beleza do Campo™, Barretos, SP), tendo sua composição β-pineno 0,6%, piperitona 0,2%, nepetalactona 77,6% (componente majoritário), dihidronepetalactona 7,6%, β-cariofileno 3,2%, α-humuleno 1,7%, farneseno 1,1% e óxido cariofileno 0,6%.

Sendo o OEN um produto hidrofóbico, uma solução estoque foi preparada a partir de sua pré-diluição em etanol (96%) na proporção 1:9, de onde foram retiradas alíquotas para os testes anestésicos em diferentes concentrações. O PRP foi adicionado diretamente à água de indução, sem a necessidade de se proceder pré-diluição. Ambos os produtos foram estocados em frascos de vidro amarelo-âmbar à temperatura de 4°C, até o momento de seu uso. Para avaliação da eficácia dos anestésicos, foram testadas cinco concentrações de PRP e OEN de acordo com avaliações preliminares para a definição de faixas-teste.

Os testes foram realizados em dois aquários de vidro com capacidade para 2 L (1 Litro de volume útil) e a mesma água, proveniente dos tanques de manutenção foi utilizada nos ensaios. Em um aquário, foi adicionado o anestésico para a indução da anestesia, enquanto que outro isento do produto, foi utilizado para a recuperação dos peixes. A água foi totalmente trocada e os aquários foram lavados a cada teste.

Previamente aos testes, os animais permaneceram em jejum por um período de 24 horas. Para a avaliação das latências para anestesia, os animais foram rapidamente transferidos, de forma aleatória, para o aquário com anestésico utilizando-se um puçá. Foram então registrados os tempos em que os peixes atingiram os diferentes estágios de indução anestésica. Ao atingirem o último estágio de anestesia, os peixes foram medidos, pesados e imediatamente transferidos para um aquário sem anestésico, onde foram observados e registrados os diferentes tempos para os estágios de recuperação. Para cada concentração foram utilizados 10 peixes (n = 10), sendo cada animal observado individualmente, utilizado uma única vez e considerado uma réplica. As latências para os diferentes estágios de indução ou recuperação foram registradas de

forma cumulativa, utilizando-se para isso, um cronômetro digital. A caracterização comportamental para cada estágio foi feita com base no trabalho de Park *et al.* (2008) com modificações e está apresentada na Tabela 1.

Para verificação se houve interferência do veículo (etanol) utilizado na pré-diluição do OEN, cinco peixes foram monitorados em um aquário idêntico ao que foi utilizado nos testes, adicionado de etanol em quantidade correspondente ao mesmo volume utilizado para a pre-diluição da maior concentração de OEN testada.

Tabela 1: Estágios comportamentais de anestesia e de recuperação em peixe.

ESTÁGIOS	CARACTERÍSTICA COMPORTAMENTAL
<b>Indução</b>	
A <sub>1</sub>	Agitação
A <sub>2</sub>	Perda de equilíbrio e natação errática
A <sub>3</sub>	Ausência de reação a estímulos mecânicos e visuais, paralização corporal completa
<b>Recuperação</b>	
R <sub>1</sub>	Início da natação errática e recuperação do equilíbrio
R <sub>2</sub>	Natação normal

Modificado de Park *et al.*, 2008.

Após os testes, os peixes foram transferidos para tanques de 200 L de água doce, similares aos tanques utilizados na estocagem, e monitorados por 72 h para verificação de eventuais mortalidades.

### 4.3. Marcadores de eletrofisiologia

Os registros eletrofisiológicos avaliados foram: eletromiograma (EMG), intensidade de batimentos operculares (IBO), frequência dos batimentos operculares (FBO) e eletrocardiograma (ECG). O método de análise utilizado para a captação dos registros seguiu metodologia descrita por Pineda et al. (2011) com modificações e Barbas et al. (2017).

#### 4.3.1. REGISTROS ELETROMIOGRÁFICOS (EMG).

Para os registros eletromiográficos, foram confeccionados eletrodos em aço inox com 4,0 mm de comprimento e 0,02 mm de diâmetro, fixados no músculo dorsal com acrílico auto-polimerizante, 2,0 mm logo abaixo da nadadeira dorsal. Após o procedimento de implante, os animais foram levados individualmente até à câmara de experimentação, onde os eletrodos foram conectados a um amplificador de alta impedância para registro.

Todos os procedimentos para obtenção dos registros foram realizados dentro de uma gaiola de Faraday de metal ecrã. Os registros duraram 5 min para cada animal dos grupos/tratamentos propostos: controle (basal e etanol), indução (OEN e PRP) e recuperação (OEN e PRP).

#### 4.3.2. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)

Para o monitoramento cardíaco, os eletrodos foram construídos em aço inox com 0,3 mm de diâmetro e 5,0 mm de comprimento, de forma não-conjugada. A posição de fixação do eletrodo de referência obedeceu a indicação do vetor cardíaco, sendo fixado na parte ventral, 0,2 mm após o término da cavidade opercular e o eletrodo de registro foi inserido 2,0 mm abaixo da nadadeira peitoral, com acrílico auto-polimerizante. Posteriormente, os eletrodos foram conectados a um amplificador de alta impedância.

#### 4.3.3. FREQUÊNCIA DE BATIMENTO OPERCULAR (FBO) E INTENSIDADE DE BATIMENTOS OPERCULARES (IBO)

Para a avaliação respiratória, dois eletrodos em aço inox com 0,3 mm de diâmetro e 4,0 mm de comprimento (de referência e de registro), conjugados a uma distância de 0,2 mm um do outro, foram fixados na cavidade opercular 5,0 mm acima da nadadeira peitoral e conectados a um amplificador de alta impedância, que possibilitou o registro dos movimentos operculares, permitindo medições da intensidade e da frequência de fechamento opercular.

Os animais não foram anestesiados para o posicionamento dos eletrodos em nenhum dos casos, de maneira a evitar que houvesse interferência de efeito anestésico previamente ao início dos registros.

#### 4.3.4. GRAVAÇÃO E ANÁLISE DOS REGISTROS

Os eletrodos foram ligados a um sistema de aquisição de dados digital através de um amplificador diferencial de alta impedância de entrada (Grass Technologies, Modelo P511), ajustado com filtragem de 0,3 e 300 Hz, com amplificação de 2000X e monitorados com um osciloscópio (ProteK, Modelo 6510). Os registros foram continuamente digitalizados a uma taxa de 1 KHz em um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX), e foram

armazenados em disco rígido e posteriormente processados através de um software especializado.

As análises dos sinais adquiridos foram possíveis com auxílio de uma ferramenta construída na linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib foi utilizada para a elaboração dos gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando-se a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude demonstram as diferenças de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Os sinais dos registros foram observados em 1000 amostras por segundo. Os espectrogramas foram calculados utilizando-se uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos) e cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método periodograma médio de Welch. O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal com o uso da janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição com o PSD, resultando em um histograma que foi construído com caixas de 1 Hz.

Para analisar as diferenças, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído. Cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e sendo calculados a média e o desvio padrão de cada grupo. Para o cálculo da janela PSD Hamming foram utilizados 256 pontos sem sobreposição.

#### **4.4. Análise Estatística**

Para verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Como as variâncias não poderiam ser homogeneizadas para latências em relação aos estágios A1, A2, R1 e R2 na anestesia de OEN, e A1 e A3 no caso de anestesia com Propofol, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado seguido por comparações múltiplas de ranks médios para todos os grupos (Zar, 1996). Para o restante dos dados referentes às latências para a anestesia, as suposições foram satisfeitas e, portanto, os testes one-way ANOVA e Tukey foram realizados para comparações de médias pareadas. As tendências de latências para anestesia profunda (A3) e recuperação completa (R2) foram ajustadas por meio de modelos de resposta linear e não linear, com tempos medidos para atingir os estágios, sendo as variáveis de resposta e concentração do anestésico as

variáveis preditoras. O nível mínimo de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  em todos os casos. O software GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 foi utilizado para as análises e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo em todos os casos.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Análise Comportamental**

Foram utilizadas 5 concentrações para determinação da concentração ideal de OEN e PRP (tabela 1). Durante a experimentação com o OEN, o tambaqui apresentou hiperatividade logo quando em contato com o óleo em todas as as concentrações testadas. foi observada uma diminuição acentuada para atingir o estágio A1 entre concentrações de 125 e 150  $\mu\text{L L}^{-1}$ , quando usados concentrações maiores 200 e 225  $\mu\text{L L}^{-1}$  observou se maior irritabilidade em comparação às concentrações menores e um rápido acesso ao estágio de indução A3, o que pode ser considerado como muito agressivo, mesmo não sendo registrados mortalidades durante o experimento e em um espaço de 72 horas de monitoramento após experimentação. È importante salientar que todas as concentrações obtiveram resultados de indução total e recuperação total, a dose de 175  $\mu\text{L L}^{-1}$  de OEN foi a considerada ideal para anestesiamento por conseguir o relaxamento total em tempo próximo a 3 minutos (160 segundos) o que é considerado ideal (BELL, 1987; IWAMA & ACKERMAN, 1994; ROSS & ROSS, 2008).

Com relação ao propofol (PRP) não observou-se hiperatividade em contato com o mesmo, e observou-se um certo padrão de anestesia na fase A1, onde nas concentrações de 2, 4 e 6  $\mu\text{L L}^{-1}$  houve o mesmo tempo de indução, já nas concentrações superiores (8 e 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) houve um decréscimo no tempo de alcance de A1. A concentração considerada ideal de propofol foi de 4  $\mu\text{L L}^{-1}$ , no entanto, com relação a recuperação, nenhuma das concentrações foi capaz de determinar recuperação em até 5 minutos. a concentração de 2  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi posterior a 30 minutos.

Durante o monitoramento pós-experimento com o PRP, observou-se mortalidades de peixes nas concentrações de 6, 8 e 10  $\mu\text{L L}^{-1}$  durante o monitoramento de 72 horas.

A água em grupo controle simulado e a água composta unicamente com adição de etanol mesmo volume da maior concentração de EON usada não produziram nenhum sinal comportamental de anestésico em tambaqui ao longo de 30 minutos de observação.

Tabela 1. Latências para os estágios de indução e recuperação (segundos  $\pm$  SD) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* expostos a concentrações anestésicas de óleo essencial de *Nepeta cataria* e Propofol.

Concentração	[ $\mu\text{L L}^{-1}$ ]	Estágios de Indução (s)			Estágios de Recuperação (s)	
		A1	A2	A3	R1	R2
<i>Nepeta Cataria</i>	125	9 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	186 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	571 $\pm$ 144 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 22 <sup>ab</sup>	254 $\pm$ 100 <sup>a</sup>
	150	5 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	135 $\pm$ 39 <sup>ab</sup>	297 $\pm$ 30 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	230 $\pm$ 39 <sup>a</sup>
	175	5 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	52 $\pm$ 19 <sup>bc</sup>	160 $\pm$ 13 <sup>cd</sup>	51 $\pm$ 22 <sup>ab</sup>	165 $\pm$ 28 <sup>ab</sup>
	200	9 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	46 $\pm$ 5 <sup>bc</sup>	138 $\pm$ 14 <sup>d</sup>	27 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	134 $\pm$ 9 <sup>bc</sup>
	225	5 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	31 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	95 $\pm$ 16 <sup>e</sup>	29 $\pm$ 15 <sup>bc</sup>	108 $\pm$ 15 <sup>c</sup>
Propofol	2	7 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	401 $\pm$ 99 <sup>a</sup>	258 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	> 1800
	4	7 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 10 <sup>bc</sup>	119 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	70 $\pm$ 23 <sup>c</sup>	749 $\pm$ 232 <sup>a</sup>
	6	7 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	92 $\pm$ 23 <sup>bc</sup>	126 $\pm$ 39 <sup>b</sup>	507 $\pm$ 218 <sup>a</sup>
	8	4 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	61 $\pm$ 18 <sup>c</sup>	105 $\pm$ 55 <sup>bc</sup>	484 $\pm$ 205 <sup>a</sup>
	10	5 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	23 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	45 $\pm$ 17 <sup>c</sup>	96 $\pm$ 41 <sup>bc</sup>	515 $\pm$ 144 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna dentro do mesmo anestésico denotam diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ),  $n = 10$ .

Em ambos os produtos testados observou-se que as equações de regressão obtidas demonstram uma clara redução nas latências à medida em que se aumentou as concentrações. Para a anestesia com o OEN, os dados de latência foram melhor ajustados por equação matemática do tipo potencial ( $y = 1\text{E}+09x^{-3,012}$ ,  $R^2 = 0,98$ ) (figura 1), enquanto que para o PRP o melhor modelo matemático foi o de equação polinomial ( $y = 17,069x^2 - 275,2x + 1568,3 / R^2 = 0,97$ ) (Figura 2). Para ambos os casos, nas equações, o “y” corresponde ao tempo necessário para anestesia profunda (A3) e “x” a concentração de OEN ou PRP.

Com relação a recuperação, observou-se que o OEN determinou um padrão linear de resposta ( $y = -1,5586x + 450,9 / R^2 = 0,97$ ) (figura 1), enquanto que a latência para a recuperação pós-anestesia com PRP foi melhor explicada por uma equação potencial ( $y = 907,56x^{-1,315} / R^2 = 0,98$ ) (figura 2). Para ambos os casos, nas equações, o “y” corresponde ao tempo necessário para recuperação total (R2) e “x” a concentração de OEN ou PRP.

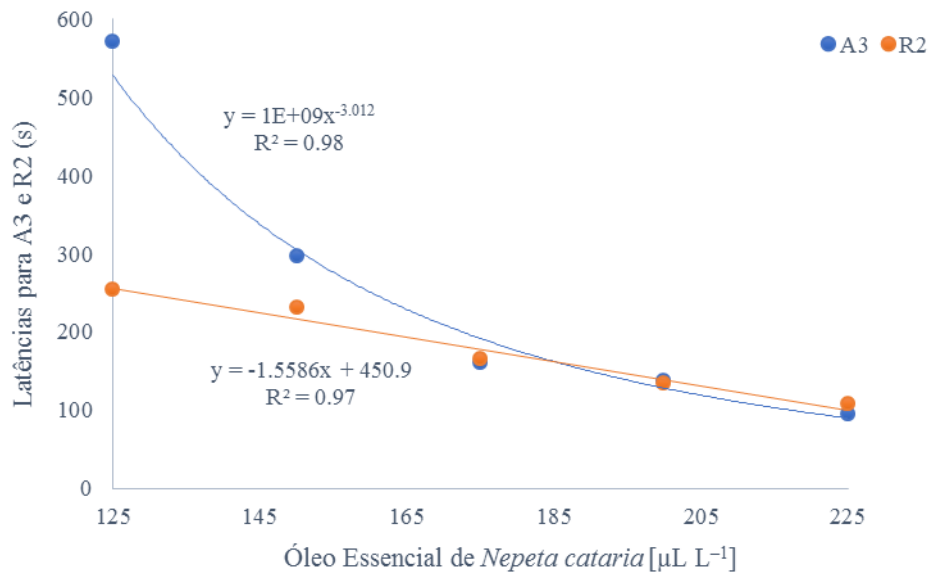


Figura 1: Latências para os estágios de anestesia de profunda (A3) e recuperação (R2) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* submetidos a banho anestésico utilizando-se concentrações crescentes de óleo essencial de *Nepeta cataria*.

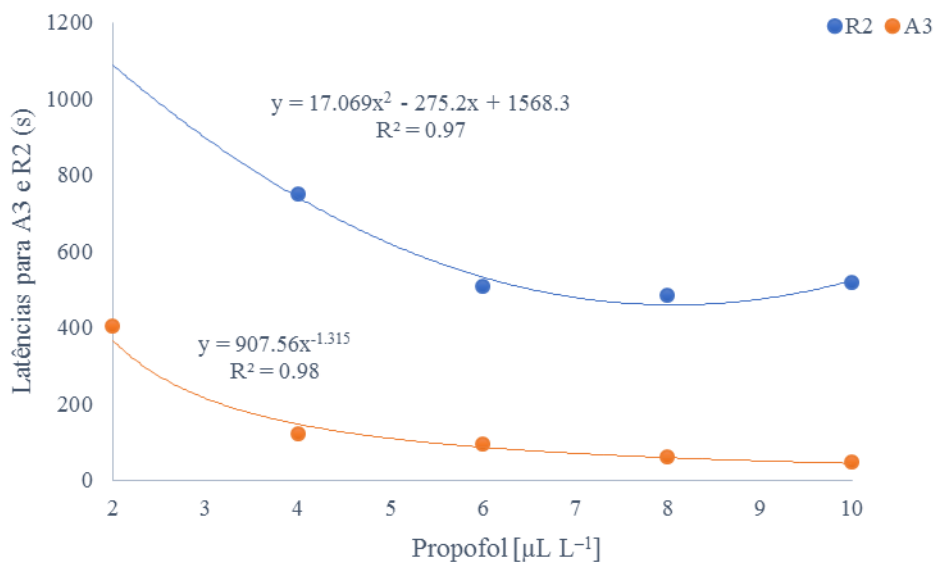


Figura 2: Latências para os estágios de anestesia profunda (A3) e recuperação (R2) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* submetidos a banho anestésico utilizando-se concentrações crescentes de propofol.

## 5.2. Caracterização Eletrofisiológica

Uma vez que não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre as médias de amplitude e frequência do controle basal e o controle etanol, utilizou-se somente os valores médios de controle basal para fins de comparação entre médias em todos os casos.



### 5.2.1. ELETROMIOGRAFIA (EMG)

O registro eletromiográfico basal demonstrou que durante o processo de contração do músculo dorsal a amplitude nos traçados é elevada (Figura 3 A, à esquerda), com contrações intensas em condições normais. O padrão do traçado está apresentado em um fragmento amplificado do registro conforme Figura 1 A (ao centro). O espectrograma de frequência demonstrou o padrão de distribuição da intensidade de energia durante as contrações normais em frequências de até 50 Hz (Figura 3 A, à direita). A média de amplitude das contrações do registro basal foi de  $24,95 \pm 3,94$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup> (Figura 4).

Após o contato dos animais com o óleo, mais especificamente durante a primeira metade da indução (Ind IOEN) com o OEN, ainda houve contração muscular intensa (Figura 3 B, à esquerda e à direita) registrando-se uma amplitude média de  $22,37 \pm 8,69$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup> nesse intervalo (Figura 4). Posteriormente, durante a segunda metade do registro (Ind IIOEN), houve relaxamento muscular conforme constatado também no respectivo espectrograma de frequência (Figura 3 B, à direita). Nesse intervalo, a amplitude registrada foi em média de  $0,01 \pm 0,01$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup>, apresentando-se significativamente menor em relação às amplitudes médias registradas nos animais controle e durante a Ind IOEN (Figura 4).

O PRP determinou uma diminuição tempo-dependente na amplitude do traçado, observável durante a primeira metade do período de indução (Ind IPRP) (Figura 3 C, à esquerda e à direita), com uma redução da força de contração muscular durante o contato, sem que os animais apresentassem espasmos musculares característicos de excitabilidade central. O período de Ind IIPRP seguiu, portanto, com aparente diminuição de força muscular, conforme corroborado pelo espectrograma que indicou redução da intensidade de energia ao longo do registro (Figura 3 C, à direita). Entretanto, a média de amplitude observada na Ind IPRP foi de  $1,64 \pm 0,48$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup>, sendo menor ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle ( $24,95 \pm 3,94$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup>) mas mantendo-se indistinta ( $p > 0,05$ ) da média observada no período de indução final (Ind IIPRP) ( $0,01 \pm 0,005$  mV<sup>2</sup>/Hz x 10<sup>-3</sup>) (Figura 4).

Em relação à recuperação dos indivíduos pós-anestesia, observou-se durante a primeira metade da recuperação após exposição ao OEN, amplitudes baixas no traçado, sendo esse ainda um reflexo da persistência do quadro anestésico, também corroborado pelo espectrograma de frequência até 150 s de registro (Rec IOEN). Entretanto, após os 150 s (Rec IIOEN) de registro, houve o retorno progressivo da atividade muscular com

reversibilidade da perda de tônus muscular conforme observado no traçado e no espectrograma de frequência (Figura 3 B, à esquerda e direita). A média das amplitudes registrada no tempo total de registro durante a recuperação pós-exposição ao OEN (Rec OEN) foi de  $2,35 \pm 1,10 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ , entretanto, mantendo-se ainda significativamente mais baixa comparativamente à média registrada no controle ( $24,95 \pm 3,94 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) (Figura 4).

Durante a recuperação pós-exposição ao PRP (Figura 5 C, à esquerda), observa-se que na primeira metade do registro não há indicativo no traçado de contração muscular significativa, sendo que a partir da segunda metade do tempo de recuperação, os indivíduos começam a demonstrar mais claramente o retorno do tônus muscular, de forma lenta porém progressiva como também evidenciado pelo espectrograma de frequência (Figura 5 C, à direita).

Durante o tempo total de recuperação estabelecido pós-anestesia com PRP (Rec PRP) o mesmo padrão foi observado comparativamente à recuperação após anestesia com OEN, sendo que a média de amplitude ( $0,67 \pm 0,45 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) observada durante a recuperação também esteve menor ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle (Figura 5).

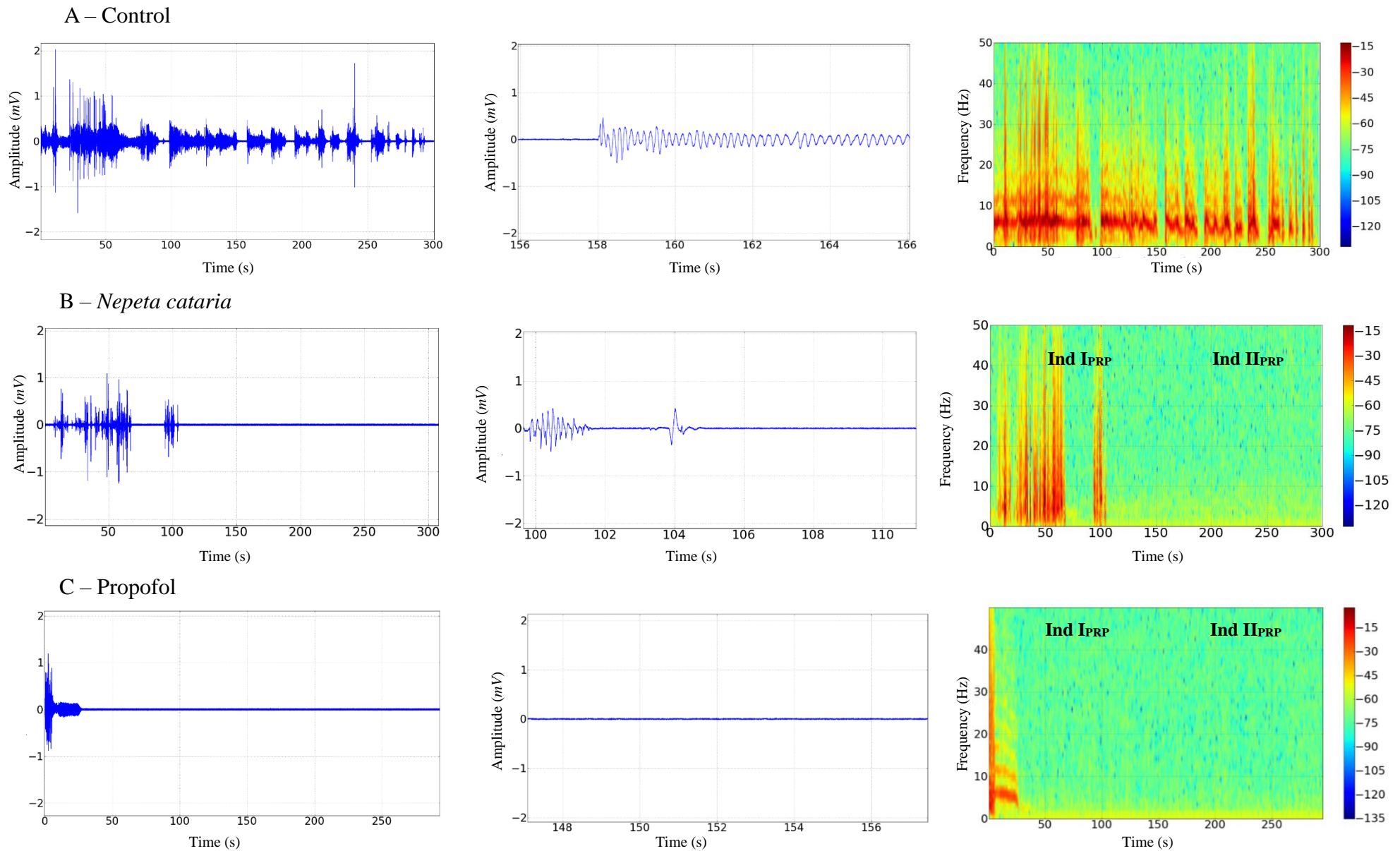


Figure 3. Registros Eletromiográficos (EMG) do tambaqui, *Collossoma macropomum* em estado basal (A), submetido a banhos de curta duração com óleo essencial de *Nepeta cataria* – OEN a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$ (B) e Propofol – PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  (C). Registros realizados em 300 s (à esquerda), amplificação dos fragmentos dos traçados (ao centro) e espectrograma de frequência (à direita). Os intervalos iniciais (1 a 150s) e finais (150 a 300s) da indução durante a anestesia com OEN ou PRP estão representados respectivamente por Ind IOEN; Ind IIOEN e Ind IPRP; Ind IIPRP nos espectrogramas de frequência.

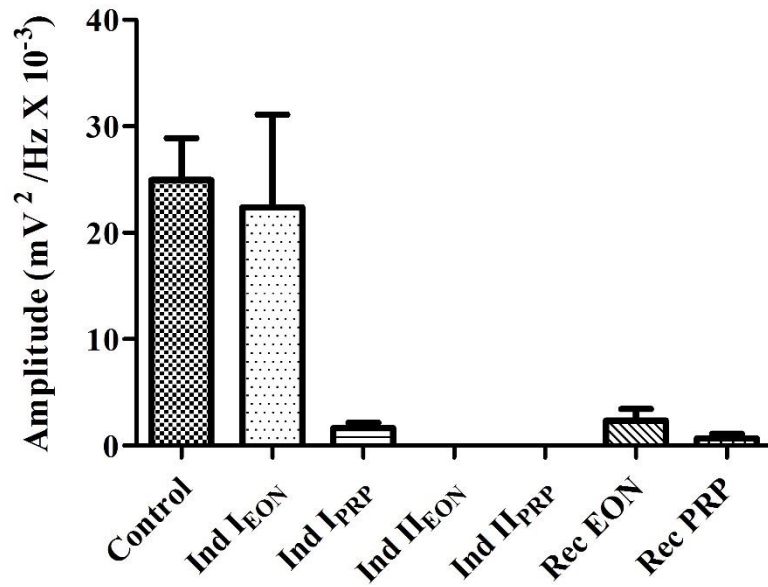
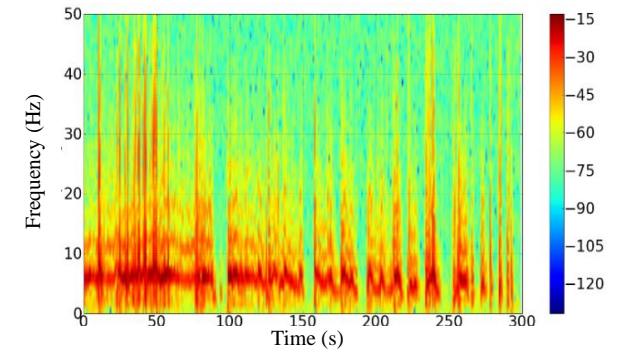
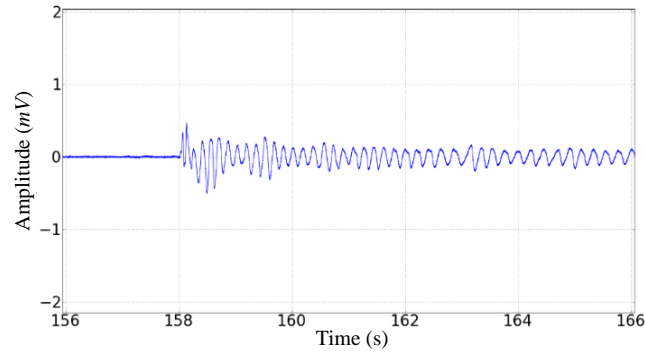
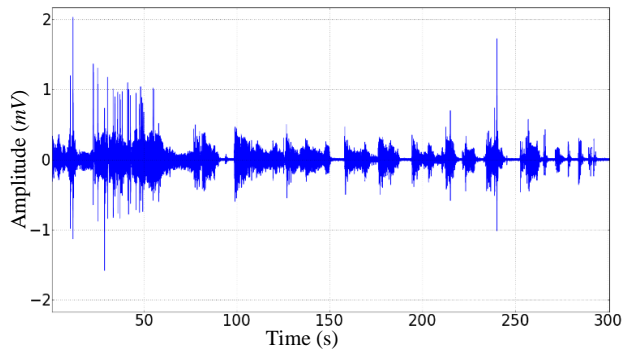
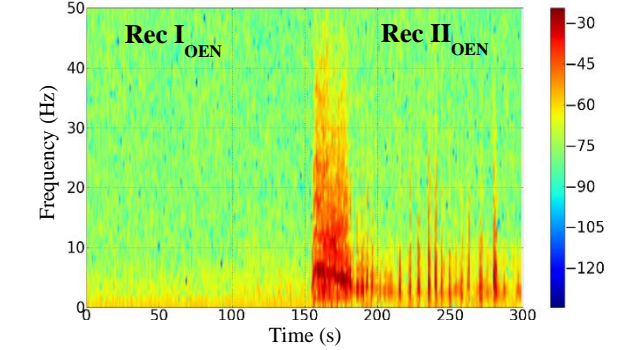
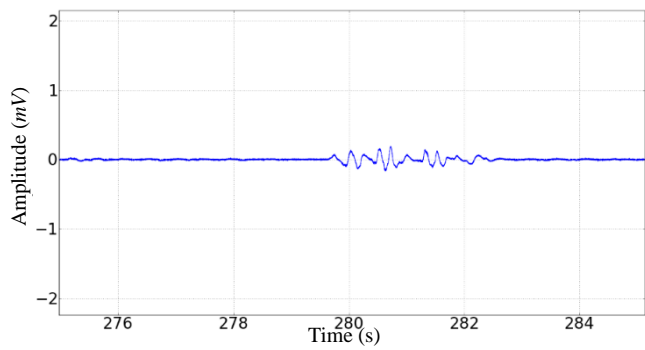
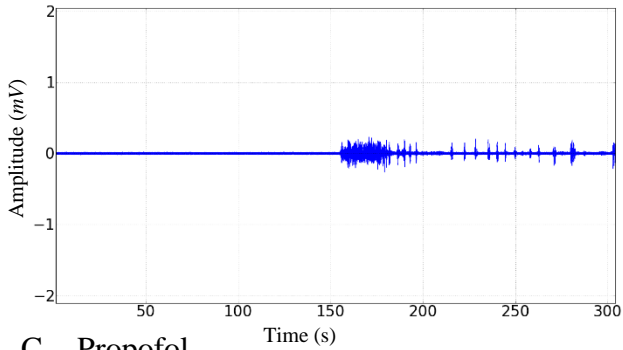


Figure 4. Amplitudes médias registradas durante o eletromiograma (EMG) de juvenis de *Collossoma macropomum* submetidos à anestesia com óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) e Propofol (PRP). Registros realizados em 300s nos animais controle, em indivíduos submetidos à banho anestésico com OEN a 175  $\mu\text{L L}^{-1}$ , PRP a 4  $\mu\text{L L}^{-1}$  e durante a recuperação pós-anestesia (Rec OEN e Rec PRP) em frequências de até 50 Hz. Os períodos de Ind I e Ind II correspondem a média de amplitude de intervalos padronizados de 1 a 150 s e 150 a 300 s, respectivamente. Asteriscos (\*\*\*) sobre as colunas indicam diferenças significativas em relação ao registro basal (Controle) enquanto que sinais positivos (+++  $p < 0,0001$ ) denotam diferenças significativas entre as médias de amplitude de Ind II em relação à Ind I no caso da anestesia com OEN [ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ )].

### A – Control



### B - *Nepeta cataria*



### C - Propofol

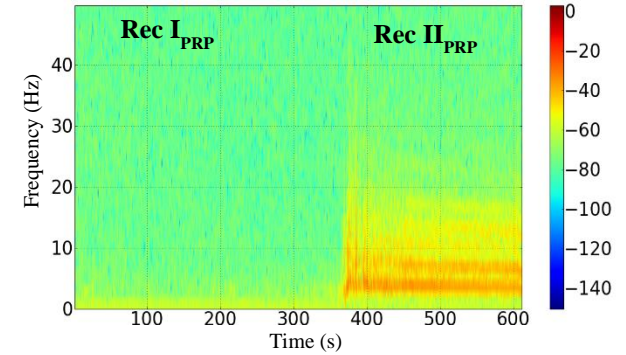
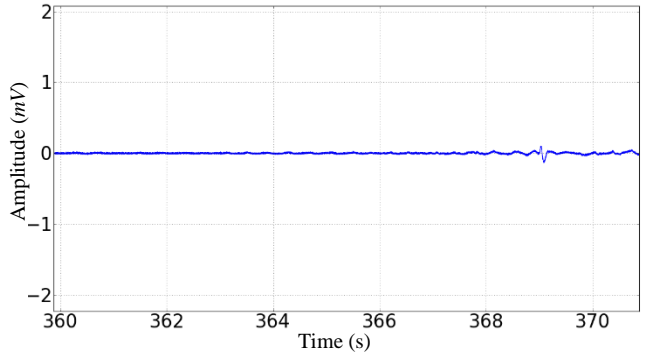
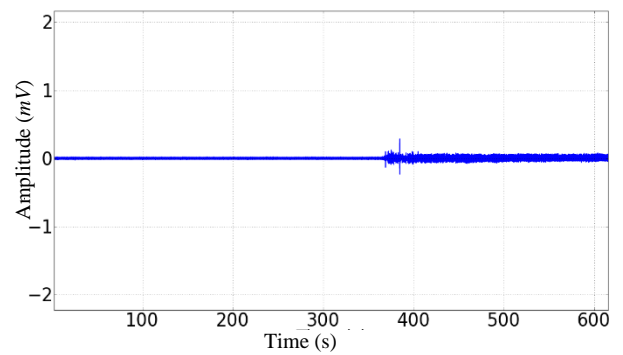


Figure 5 Registros Eletromiográficos (EMG) do tambaqui, *Collossoma macropomum* em recuperação após banho de curta duração com óleo essencial de *Nepeta cataria* – OEN a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  (A) e Propofol – PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  (B). Registros realizados em 300s (à esquerda), amplificação dos fragmentos dos traçados (ao centro) e espectrograma de frequência (à direita). Os intervalos iniciais (1 a 150s) e finais (150 a 300s) da recuperação após a anestesia com OEN ou PRP estão representados respectivamente por Rec I<sub>OEN</sub>; Rec II<sub>OEN</sub> e Rec I<sub>PRP</sub>; Rec II<sub>PRP</sub> nos espectrogramas de frequência.

### 5.2.2. ELETROCARDIOGRAMA (ECG) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)

O eletrocardiograma normal do tambaqui com a demonstração de todas as deflagrações cardíacas pode ser visualizado na Figura 6 A. Durante a anestesia, independentemente do anestésico utilizado, o coração manteve sua ritmicidade (Figura 6 B e C), o que também foi constatado durante a recuperação pós-anestesia com OEN, não havendo impacto negativo sobre a ritmicidade do batimento cardíaco (Figura 6 D). Diferentemente, durante a recuperação pós exposição ao PRP, observou-se traçado característico de arritmia cardíaca (Figura 6 E).

A média de FC nos animais controle foi de  $100 \pm 9$  bpm e durante o banho com OEN ou PRP a frequência diminuiu ( $p < 0,05$ ) para  $57 \pm 4$  e  $58 \pm 3$  bpm, respectivamente, em relação ao registro basal. Durante a recuperação pós-anestesia com OEN e PRP, foram registradas médias de FC de  $92 \pm 5$  e  $86 \pm 4$  bpm, respectivamente, sendo esses valores médios maiores ( $p < 0,05$ ) comparativamente aos valores observados durante a indução, apesar de ainda significativamente mais reduzidos em relação aos controles (Figura 7).

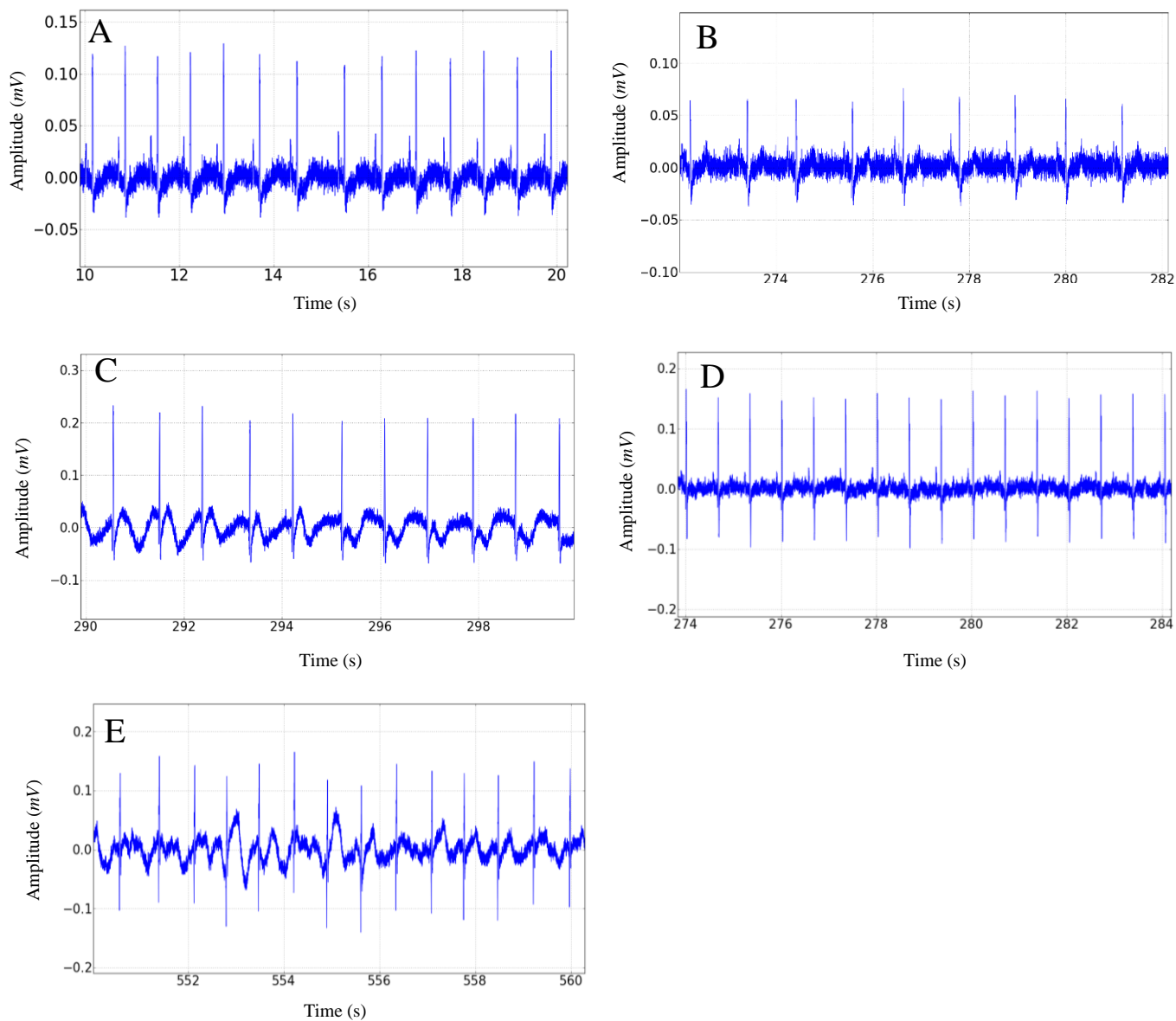


Figure 6. Registro eletrocardiográfico (ECG) normal do tambaqui, *Collossoma macropomum* (A), durante a indução anestésica com óleo essencial de *Nepeta cataria* – OEN a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  (B) e Propofol – PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  (C). Os traçados de ECG durante o retorno da anestesia em água livre de OEN e PRP estão demonstrados em D e E, respectivamente.



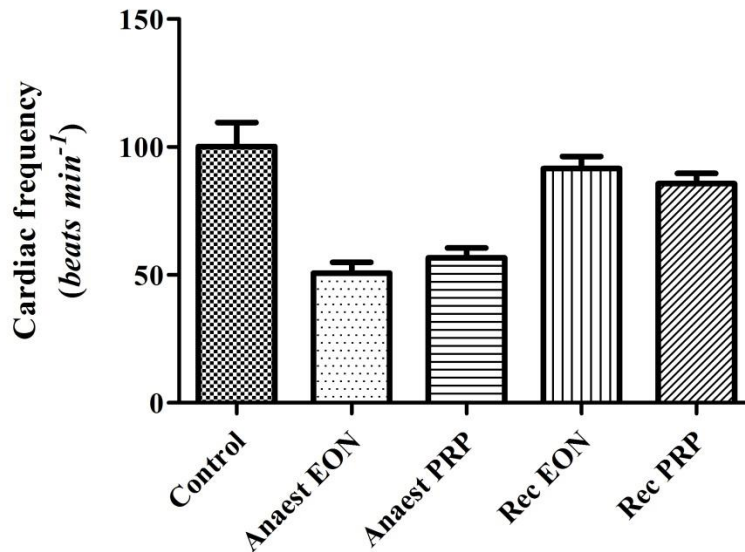


Figure 7. Comparação entre as médias de frequência cardíaca (FC) registradas em estado basal (Controle) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* e durante a indução anestésica com o óleo essencial de *Nepeta cataria* a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  (OEN) e Propofol a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  (PRP). Asteriscos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; \*  $p < 0,05$  sobre as colunas indicam diferenças significativas em relação ao registro basal (Controle) enquanto que sinais positivos (+++  $p < 0,0001$ ) denotam diferenças significativas entre a FC média de Rec EON em relação à Anaest EON e Rec PRP relativamente à Anaest PRP [ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ )].

### 5.2.3. INTENSIDADE DE BATIMENTOS OPERCULARES (IBO) E FREQUÊNCIA DE BATIMENTO OPERCULAR (FBO)

As amplitudes de IBO no grupo controle foram relativamente constantes ao longo do registro (Figura 8 A, à esquerda), sendo a mesma regularidade observada no fragmento de traçado amplificado (Figura 8 A, ao centro). O espectrograma de frequência demonstra o padrão de distribuição da intensidade de energia durante os batimentos normais em frequências de até 50 Hz (Figura 8 A, à direita). A força de batimento opercular do tambaqui em estado basal foi de  $2.58 \pm 0.49 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  (Figura 10).

Durante a indução anestésica com o OEN foi observado inicialmente picos no traçado, seguidos de relativa redução até 150 s e posterior aumento de intensidade (Figura 8 B, à esquerda). Na amplificação de fragmento do traçado é possível observar que houve manutenção da intensidade, entretanto com um aparente aumento da frequência das ondas (Figura 8 B, ao centro) comparativamente ao traçado amplificado no controle (Figura 8 A, ao centro). O espectrograma de frequência (Figura 8 B, à direita) demonstra intensidade de energia relativamente semelhante ao controle, o que foi corroborado pelos valores médios de IBO indistintos ( $p > 0,05$ ) entre os animais sob anestesia com OEN ( $3.24 \pm 0.92 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) e valores basais (Figura 10).



Quando induzido com o PRP observou-se uma redução da IBO (Figura 8 C, à esquerda), visualizável também na ampliação do traçado (Figura 8 C, ao centro). Uma mais baixa intensidade de energia (Figura 8 C, à direita) e um menor ( $p < 0,05$ ) valor de amplitude média ( $0.38 \pm 0.06 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) (Figura 10) foram verificados quando comparados com o espectrograma de frequência e valor de amplitude média do grupo controle.

Durante a recuperação, após a exposição ao OEN, houve um inesperado aumento da IBO (Figura 9 B, à esquerda) com valores de amplitudes médias de  $3.78 \pm 1.03 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  (Figura 10) e maior irregularidade nos traçados (Figura 9 B, ao centro) assim como um relativamente maior gasto de energia durante o tempo estabelecido para a recuperação (Figura 9 B, à direita).

Durante o intervalo de tempo estabelecido para monitoramento da recuperação do PRP verificou-se persistência do quadro anestésico (Figura 9 C, à esquerda), também evidenciados pela ampliação do traçado (Figura 9 C, ao centro) e na distribuição de energia (Figura 9 C, à direita). O valor da amplitude média observada foi de  $1.29 \pm 0.25 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  durante a recuperação, sendo menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao registro controle, entretanto significativamente maior em comparação à média registrada durante à indução com PRP (Figura 10).

A FBO do tambaqui em estado basal demonstrou média de  $99 \pm 11$  movimentos por minuto (bpm). Durante a indução anestésica com o OEN foi observada uma relativa manutenção da FBO com média de frequência de  $104 \pm 5$  bpm durante a primeira metade da indução (Ind IOEN). Durante o intervalo Ind IIOEN, a FBO foi de  $123 \pm 4$ , demonstrando frequência aumentada ( $p < 0,05$ ) relativamente ao controle. A FBO durante a recuperação da anestesia (Rec OEN) retornou ao normal quando os animais foram alocados à água livre de OEN, apresentando média de  $96 \pm 3$  bpm (Figura 11).

Durante a indução com o PRP houve diminuição ( $p < 0,0001$ ) na frequência de abertura opercular de maneira tempo-dependente em relação ao controle. A fase inicial de indução (Ind IPRP) demonstrou média de frequência de movimentos operculares de  $71 \pm 11$  bpm, sendo significativamente menor em relação ao controle. Durante a segunda metade da indução (Ind IIPRP) a FBO caiu para  $40 \pm 4$  bpm, sendo significativamente menor em relação ao controle e também em relação ao período Ind IPRP. No retorno da anestesia profunda provocada pelo PRP, os movimentos foram

gradativamente sendo reestabelecidos com média de  $105 \pm 8$  bpm, indicando reversibilidade.

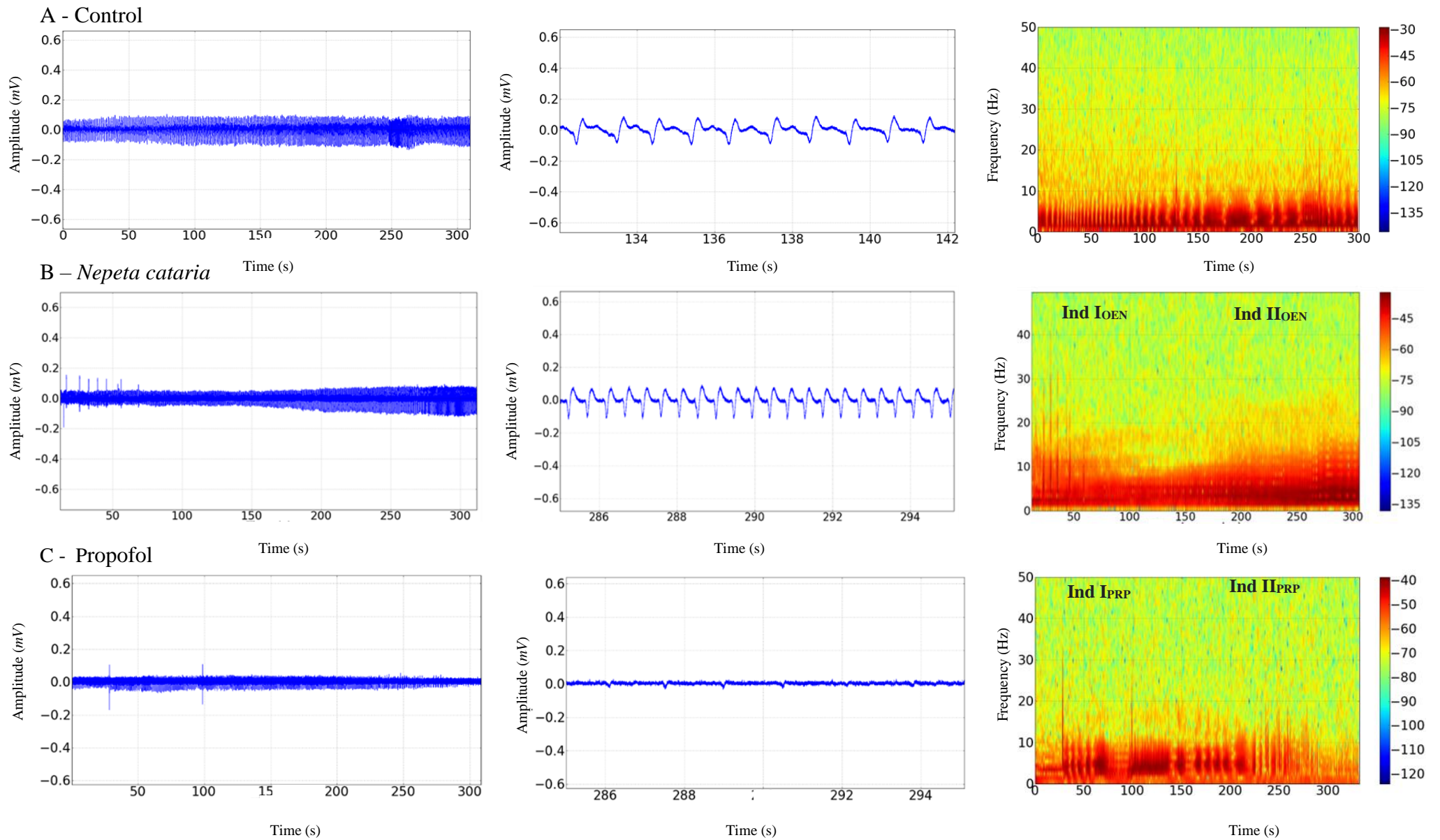


Figure 8. Registros da intensidade de batimentos operculares (IBO) do tambaqui, *Colossoma macropomum* em estado basal (A) e submetido a banho de curta duração com óleo essencial de *Nepeta cataria* – OEN a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$  (B) e Propofol – PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$  (C). Registros realizados em 300 s (à esquerda), amplificação dos fragmentos dos traçados (ao centro) e espectrograma de frequência (à direita). Os intervalos iniciais (1 a 150s) e finais (150 a 300s) da indução durante a anestesia com OEN ou PRP estão representados respectivamente por Ind IOEN; Ind IIOEN e Ind IPRP; Ind IIPRP nos espectrogramas de frequência.

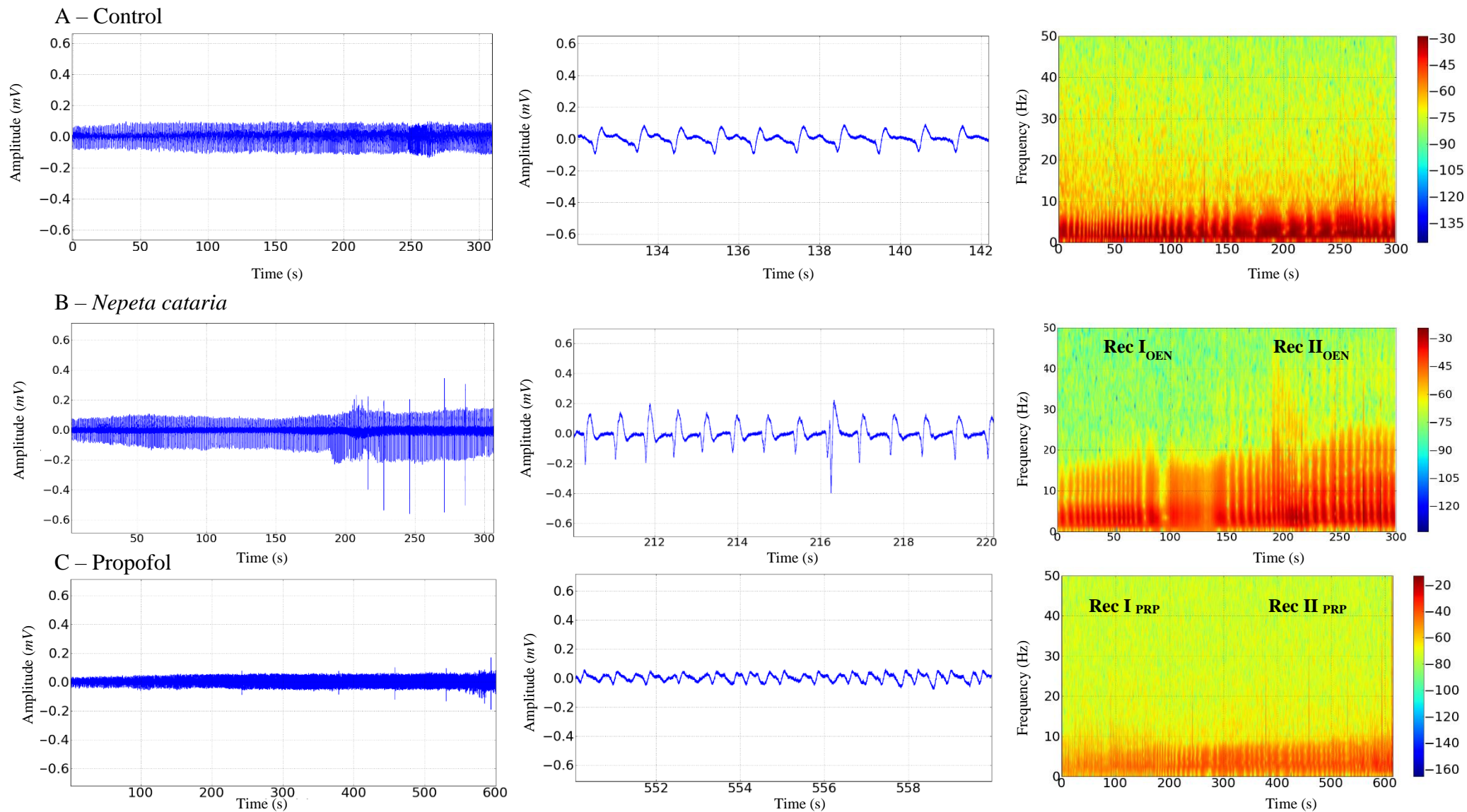


Figure 9. Registros da intensidade de batimentos operculares (IBO) do tambaqui, *Collossoma macropomum* durante a recuperação após banho de curta duração com óleo essencial de *Nepeta cataria* – OEN a  $175 \mu\text{L L}^{-1}$ (A) e Propofol – PRP a  $4 \mu\text{L L}^{-1}$ (B). Registros realizados em 300 s (à esquerda), amplificação dos fragmentos dos traçados (ao centro) e espectrograma de frequência (à direita). Os intervalos iniciais (1 a 150s) e finais (150 a 300s) da recuperação após a anestesia com OEN ou PRP estão representados respectivamente por Rec I<sub>OEN</sub>; Rec II<sub>OEN</sub> e Rec I<sub>PRP</sub>; Rec II<sub>PRP</sub> nos espectrogramas de frequência.

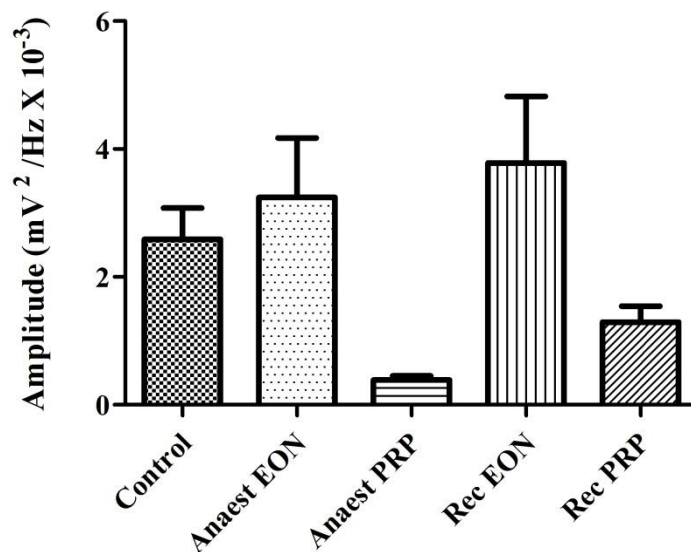


Figure 10. Registro de amplitudes médias de intensidade de batimento opercular (IBO) em juvenis de *Collossoma macropomum* submetidos à anestesia com óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) e Propofol (PRP). Registros realizados em 300s nos animais controle, em indivíduos submetidos à banho anestésico com OEN (Anaest OEN) a 175  $\mu\text{L L}^{-1}$ , PRP (Anaest PRP) a 4  $\mu\text{L L}^{-1}$  e durante a recuperação pós-anestesia (Rec OEN e Rec PRP) em frequências de até 50 Hz. Asteriscos (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,001$ ) sobre as colunas indicam diferenças significativas em relação ao registro basal (Controle) enquanto que o sinal positivo (+  $p < 0,05$ ) denota diferença significativa entre as médias de amplitude de Rec PRP e Anaest PRP [ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ )].

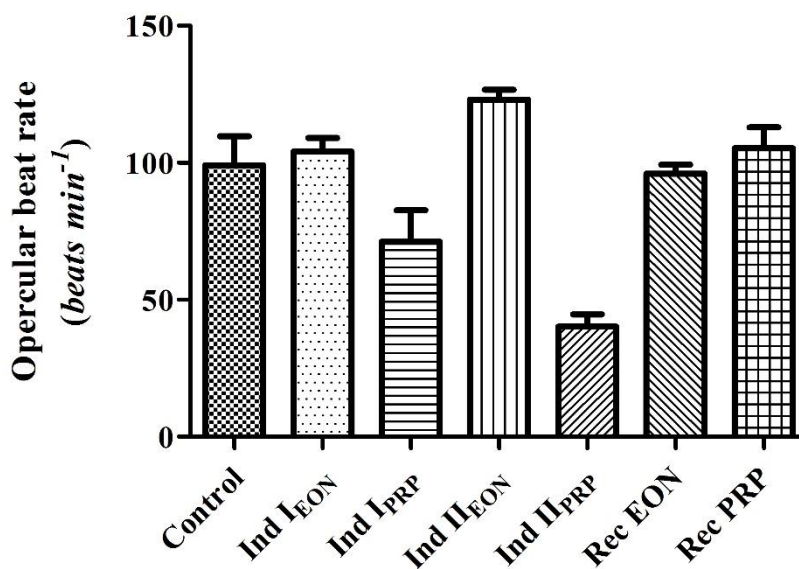


Figure 11. Frequência de batimento opercular, em batimentos por minuto (bpm), de juvenis de *Collossoma macropomum* submetidos à anestesia com óleo essencial de *Nepeta cataria* (OEN) e Propofol (PRP). Registros realizados em 300s nos animais controle, em indivíduos submetidos à banho anestésico com OEN a 175  $\mu\text{L L}^{-1}$ , PRP a 4  $\mu\text{L L}^{-1}$  e durante a recuperação pós-anestesia (Rec OEN e Rec PRP) em frequências de até 50 Hz. Asteriscos (\*\*\*)  $p < 0,0001$  sobre as colunas indicam diferenças significativas em relação ao registro basal (Controle); sinais positivos (+++  $p < 0,0001$ ) indicam diferenças significativas entre as médias de bpm de Ind II em relação à Ind I dentro do mesmo anestésico e círculos pretos (•••  $p < 0,0001$ ) denotam diferenças significativas entre as médias de bpm na recuperação e Ind II dentro do mesmo anestésico [ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ )].

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Análise Comportamental

Todas as concentrações de EON provocaram algum grau de agitação durante os estágios iniciais de indução e declínios bruscos no tempo para a fase A1, diferentemente do propofol que em nenhuma concentração determinou tal resposta. Gomes et al (2001) analisando comportamento de juvenis de tambaqui expostos a benzocaína observaram agitação e hiperatividade no estágio A1 e de forma similar ocorreu nos testes com extrato ceroso de *Spilanthes acmella* (BARBAS et al., 2016a, 2016b). O mesmo também foi verificado em testes onde utilizou-se o óleo essencial de citronela para juvenis de tambaqui (BARBAS et al, 2017). Foram observados comportamentos similares em outras espécies quando também expostas a drogas naturais e/ou sintéticas (APC, 2009; WILLIAMS et al., 2009; WONG et al., 2014). Barbas et al (2017), comentaram sobre o recorrente comportamento dos peixes nos estágios iniciais de anestesia, sendo que no presente estudo tal comportamento pareceu corroborar tal afirmação. Barbas et al (2017) identifica um padrão claro dependente da concentração em relação ao curso da indução à anestesia profunda, o que foi claramente também observado nesse estudo.

Para os dois produtos testados, OEN e PRP, as concentrações de 175  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 4  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente, foram consideradas as mais adequadas. Nessas concentrações, observou-se para o OEN anestesia profunda em 2,3 min (160 s), sendo que para o PRP essa condição foi atingida em 1,9 min (119 s), atendendo portanto aos padrões recomendados de tempos de indução e de recuperação, que devem ocorrer dentro de 3 e 5 minutos, respectivamente (BELL, 1987; IWAMA & ACKERMAN, 1994; ROSS & ROSS, 2008; BARBAS et al, 2017).

Quanto a recuperação, os produtos determinaram padrões distintos, enquanto a *Nepeta cataria* permitiu uma recuperação com clara dependência da concentração e, em todas as concentrações testadas a recuperação foi em tempo inferior a 5 min, já o propofol, além de não determinar um padrão linear de recuperação, permitiu retorno ao estado normal somente após 5 min de recuperação em água livre de anestésico.

Outros anestésicos, como benzocaína, mentol, eugenol, cera extrato de *S. acmella* e óleo essencial de citronella foram testados para tambaqui e recomendado concentrações de 100-150, 150, 65, 10-20 e 600 ppm, respectivamente (Gomes et al.,

2001; Façanha e Gomes, 2005; Roubach et al., 2005; Barbas et al., 2016a, 2016b, 2017).

Todas as drogas supracitadas foram consideradas apropriadas para promover anestesia rápida em <3 min em suas devidas concentrações recomendadas, contudo, o mentol e o eugenol permitiram a recuperação apenas após 5 min

## **6.2. Caracterização Eletrofisiológica**

Este estudo corroborou a eficácia anestésica do PRP em organismos aquáticos como relatado anteriormente (Fleming et al., 2003; Miller et al., 2005; Maclean et al., 2008; Quesada et al., 2011; Gholipour e Ahadizadeh, 2013; Valentim et al., 2016), e demonstrou pela primeira vez que a OEN atua como um agente anestésico em peixes.

Inicialmente, logo após o contato com o OEN, ocorreu contração muscular intensa seguida de perda de tônus muscular com redução de 10.3% do poder de contração ainda na primeira metade do registro, sendo que ao final do registro a força de contração foi quase que totalmente suprimida (99.9%). De outro modo, o PRP não determinou espasmos musculares característicos de excitabilidade central, havendo um relaxamento gradual e contínuo desde o início do contato até a metade do registro, onde observou-se uma diminuição de contração muscular de 93.4% e, a partir de então até o final do registro, houve intensificação do relaxamento muscular, ocorrendo a mesma redução observada para os animais expostos ao OEN, de 99.9% ao final do tempo de 5 min.

Em momentos iniciais da recuperação do OEN, as baixas amplitudes no traçado indicaram ainda uma condição de anestesia profunda, seguida de retorno gradual e progressivo do poder de contração muscular, ocorrendo reversibilidade parcial da perda do tônus. Os traçados de atividade muscular de animais em recuperação pós-exposição ao PRP indicaram ausência de contração na primeira metade do registro, e somente após a segunda metade, a atividade de contração muscular teve início, entretanto com baixas amplitudes detectadas. Em ambos os casos, apesar de constatar-se uma recuperação gradual da anestesia, não observou-se ao final do tempo estipulado para a recuperação um padrão de traçado condizente com tônus muscular normal, o que pôde também ser constatado pelos valores médios de amplitude ainda muito abaixo do normal ao final do registro, indicando a necessidade de um tempo maior que 5 min para a plena recuperação do poder de contração muscular em ambos os casos.



Barbas et al. (2017) em estudo similar examinando o efeito anestésico do óleo essencial de citronela, *Cymbopogon nardus* em tambaqui observaram inicialmente uma diminuição na amplitude da contração muscular, com espasmos musculares transitórios de pequena magnitude, antes de observar ao que denominaram de "silenciamento" na atividade muscular com perda de tônus. Houve diminuição da contração muscular dorsal de 93% durante o mesmo tempo de exposição (5 min) sendo esse um efeito miorelaxante desejável durante a anestesia. De modo semelhante, em outro estudo, onde utilizou-se óleo de cravo em concentrações que determinaram condições clínicas similares, de anestesia rápida (< 3 min) e profunda, verificou-se através de EMG um efeito miorelaxante considerável desse extrativo em três espécies de peixes amazônicos (cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, banded cichlid, *Heros severus* e angelfish, *Pterophyllum scalare*), que apresentaram perda do poder de contração muscular na ordem de 79%, 86% e 91% para o cardinal tetra, banded cichlid e angelfish, respectivamente (Fujimoto et al., 2017). Em nenhum dos casos ao longo da anestesia com citronela ou óleo de cravo, a retomada total do tônus muscular nos peixes ocorreu no período de 5 min em água livre de anestésico, assemelhando-se aos resultados deste estudo.

Enquanto alguns estudos examinaram as respostas cardioventilatórias de peixes, podendo citar à hipotermia rapidamente induzida (Donaldson et al., 2008, Seth et al., 2013), relativamente poucos descreveram essas respostas a anestésicos sintéticos (Huang et al., 2010) ou a óleos derivados de plantas e seus constituintes químicos (Barbas et al. , 2017). A bradicardia associada à hipoventilação sugere uma consequência indireta de uma depressão neuronal central ou, alternativamente, um resultado do efeito depressor direto dos anestésicos nos tecidos cardíaco e respiratório.

As respostas cardíacas de tambaqui anestesiado com qualquer dos agentes seguiu um padrão bastante esperado, resultando em reduções na frequência cardíaca. No entanto, enquanto FBO e IBO foram significativamente reduzidos em peixes expostos ao PRP, tais parâmetros foram bastante preservados em indivíduos anestesiados com OEN, o que indica uma anestesia supostamente mais segura no caso de exposição a longo prazo com este óleo em comparação com a anestesia PRP.

Sob o efeito do OEN houve uma diminuição de 43% da FC em relação ao grupo controle e, de forma similar os juvenis reagiram sob a anestesia com o PRP, onde observou-se uma redução de 42% da FC, mas nesse caso com arritmia transitória durante a indução. Durante a recuperação houve retorno à normalidade dos indivíduos



anestesiados com OEN e a mesma resposta foi verificada para os animais em retorno da anestesia com PRP, com recuperação total da função cardíaca após 5 min em água livre de anestésico.

O mesmo resultado tem sido relatado para tambaquiS submetidoS a banhos anestésicos utilizando óleo essencial de citronela, no qual este óleo determinou uma redução de 35% na FC durante anestesia profunda em relação ao controle, com arritmia transitória conforme o padrão de traçado obtido (Barbas et al., 2017). Outros anestésicos foram implicados na indução de bradicardia em peixes, como no caso do zebrafish, *Danio rerio* anestesiado com metanossulfonato de triclaína (MS-222), que é de fato o anestésico de peixe mais comumente usado em todo o mundo (Popovic et al., 2012), que foram reduzidos para 62,3%, 72,9% e 86,9% após o tratamento com 40, 30 e 20 ppm de MS-222, respectivamente, em comparação ao controle (Huang et al., 2010). Fleming et al. (2003), ao investigar os efeitos de anestesia de curta duração utilizando o propofol no esturjão do México, *Acipenser oxyrinchus* constataram durante 60 min de registro FCs significativamente deprimidas ( $48 \pm 8$  bpm) em relação aos animais controle ( $79 \pm 5$  bpm). O mesmo padrão de resposta foi descrito por Maclean et al. (2008) que em estudo de avaliação anestésica do propofol em tartarugas da espécie *Caretta caretta* observaram diminuição significativa do ritmo cardíaco.

Quando analisados os dados de IBO e FBO, os anestésicos OEN e PRP determinaram respostas relativamente distintas, em comparação aos indivíduos no estado basal. O OEN, diferentemente de outros anestésicos já testados em peixes, que normalmente deprimem a função respiratória, causou efeito oposto na segunda metade do período de indução, determinando um incremento de 25.5% na IBO. De outro modo, durante a indução com o PRP houve uma diminuição na IBO de 85.3%. Durante a recuperação observou-se também efeito distinto entre os dos dois agentes anestésicos, onde animais anestesiados com o OEN apresentaram durante os 5 min de registro uma IBO 46.5% maior que o basal. Já durante a recuperação pós-anestesia com PRP, o valor verificado foi 50% menor que o basal, o que indica, portanto, poder reduzido da força de batimento opercular em comparação à IBO de animais em retorno do OEN, apesar de não ter havido impacto sobre a FBO.

Com relação a FBO durante a indução, seguiu-se o mesmo padrão da IBO sob a ação do OEN e PRP. Na indução anestésica com o OEN, houve um aumento na fase inicial da indução de 5.1% e na segunda metade da indução o aumento foi ainda maior, alcançando 24.2% acima da FBO do grupo controle. Já o PRP determinou na FBO uma

diminuição de 28.3% na fase inicial que desacelerou mais na fase mais profunda da anestesia com diminuição de 59.6%, em comparação ao controle. Na recuperação, a FBO foi restabelecida independentemente do anestésico, o que indica reversibilidade e recuperação da atividade respiratória a despeito das discrepâncias verificadas em relação à IBO entre os anestésicos e o registro basal.

Fleming et al. (2003) reportou redução dos movimentos operculares em 40% em relação aos controles 5 min após a exposição do esturjão do México à concentrações anestésicas de PRP. Semelhantemente, Barbas et al. (2017a) observaram um decréscimo na IBO de aproximadamente 45% na indução inicial e 97.3% na indução profunda, já para a FBO a diminuição ficou em 40% relativamente à observada no instante inicial e 45% na segunda metade do registro. Tais redução foram consideradas não severas pelos autores, sendo esses achados similares ao do presente estudo com relação às respostas ao PRP.

Em resumo, PRP e OEN provocaram um relaxamento muscular conspícuo e modularam significativamente as respostas cardíacas em tambaqui. Em ambos anestésicos, foi observada uma perda de tônus muscular relacionada com o tempo e embora tenha ocorrido uma depressão cardiorrespiratória transitória em peixes expostos ao PRP, estas não eram alterações com risco de vida nas condições aqui estabelecidas, isto é, anestesia a curto prazo. Embora a frequência cardíaca tenha sido reduzida durante a anestesia com EON, a taxa de ventilação dos indivíduos permaneceu relativamente estável, sem qualquer indicação de uma possível parada respiratória.

Independentemente do anestésico utilizado, nenhuma mortalidade foi observada após um período de observação de uma semana. A dispersão da intensidade de energia observada no espectrograma de frequências estava de acordo com as oscilações nas amplitudes das diferenças de potencial observadas durante os registros de EMG e IBO durante a indução ou a recuperação da anestesia em todos os casos.

Estudos futuros são necessários para desvendar o mecanismo de ação pelo qual a EON e seus componentes promovem a anestesia geral em peixes. Assim, essa lacuna no conhecimento poderia ser considerada uma limitação para uma recomendação mais ampla desta planta extrativa como anestésico geral para peixes. Além disso, as análises eletroencefalográficas também são importantes para avaliar a extensão da depressão neuronal atingida, o que pode confirmar esse produto natural como anestésico geral para peixes.

## **7. CONCLUSÕES**

Em conclusão, sob as condições experimentais aqui estabelecidas, ambos os produtos induziram a imobilização completa do corpo e apresentaram propriedades miorrelaxantes compatíveis com a anestesia geral. A função cardíaca foi transitoriamente afetada, com diminuição da frequência cardíaca e discreta arritmia no caso de anestesia com propofol. Enquanto a capacidade ventilatória foi reduzida durante a anestesia com propofol, o óleo essencial de *Nepeta Cataria* permitiu a manutenção da ventilação normal e, portanto, coletivamente, nossos resultados sugerem que este óleo pode ser considerado um novo anestésico natural para o *Collossoma macropomum* juvenil e potencialmente para outras teleósteos espécies.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adad, J.M.T., 1982. Controle químico de qualidade da água. Guanabara Press, Rio de Janeiro. (203p)

Araujo-Lima, D., Chagas, E. C., Gomes, L. C., Brandão, F. R., 2004. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui, Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 39, 217–221.

Gomes, L. de C., Simões, L. N., Araújo-Lima, C. A. R. M., 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L. de C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2da Ed. Santa Maria: UFSM, 75–204.

Aydin, S., 1998. Nepetalactone: A new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. J. Pharm. Pharmacol., 50, 813–881.

Azambuja, C. R., Mattiazzi, J., Riffel, a. P. K., Finamor, I. A., Garcia, I. O., Heldwein, C. G., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Llesuy, S. F., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. Aquaculture 319, 156–161.

Baldisserotto, B. Fisiologia de Peixes Destinada a Piscicultura. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2009.

Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., De Garcia, L.O., Monserrat, J.M., Da Silva, T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2016a. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Aquaculture 469, 79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.012>.

Barbas, L.A.L., Stringhetta G.R., Garcia L.O., Figueiredo M.R.C., Sampaio L.A., 2016b. Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: secondary stress responses during recovery. Aquaculture 456, 70–75.

Barbas, L.A.L., Hamoy, A., Melo, V. J., Barbosa, R. P. M., Lima, H. S., Torres, M. F., Nascimento, A. S., Silva, J. K. R., Andrade, E. H. A., Gomes, M. R. F., 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. Aquaculture 479, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>

Barbosa, L. G., Moraes, G., Inoue, K. A., Antônio L., 2007. Respostas metabólicas do matrinxã submetido a banhos anestésicos de eugenol. Acta Scientiarum Biological Sciences 29, 255–260.

Bowser, P. R., 2001. Anesthetic options for fish. In: Recent Advances em Veterinary and Analgesia: Companion animals, Gleed, R. D.; Ludders, J. W (Eds.). International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, Nova York, EUA.

Brown, L. A., 1993. Anesthesia and restraint. Em: Fish Medicine (STOSKOPF, M. K. ed.), p. 79-90. Saunders, Philadelphia.

Burka, J. F., hammell, k. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J., Speare, D. J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture - a review. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 20:333-349.

Cartonilho, M. M.; Jesus, R. S. Qualidade de cortes de tambaqui cultivado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 46, n. 4, p. 344-350, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400002>

Coyle, S.D.; Durborow, R.M.; Tidwell, H.J. 2004. Anaesthetics in Aquaculture. SRAC Publication No. 3900. Southern Regional Aquaculture Center, USA.

Cunha, F. E. A., Rosa, I. L., 2006. Anesthetic effects of clove-oil on seven species of tropical reef fishes (Teleostei). J Fish Biol. 69, 1504–1512.

Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., 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, 403–406.

Dairiki, J. K.; Silva, T. B. A. Revisão de literatura: Exigências nutricionais do tambaqui – Compilações de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. Documentos; 91, p. 44. Serie III. Disponível em:<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/931300>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

Delbon, M. C. 2006. Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

Donaldson, M. R., Cooke, S. J., Patterson, D.A., Macdonald, J.S., 2008. Cold shock and fish. J Fish Biol. 73, 1491–1530.

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pg.

Fernandes, T. R. C.; Doria, C. R. C.; Menezes, J. T. B. Características de carcaça e parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em

diferentes tempos de cultivo e alimentado com rações comerciais. Boletim do Instituto de Pesca, n. 36. São Paulo. p. 45 – 52, 2010. Disponível em:<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpcesca/36\_1\_45-52.pdf>. Acesso em 22 nov. 2016.

Fischer, C.; Malta, J. C. O.; Varella, A. M. B. A fauna de parasitas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CURVIER, 1818) Characiformes: Characidae) do médio rio Solimões, Estado do Amazonas (AM) e do baixo rio Amazonas, Estado do Pará (PA), e seu potencial como indicadores biológicos. Acta Amaz, v.33, n. 4, Manaus. dec. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-9672003000400012&script=sci\\_art\\_text](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-9672003000400012&script=sci_art_text)>. Acesso em: 22 nov. 2016.

Freeman, Z. J. Amazonian aquatic resources, fishery management and aquaculture development. Senior thesis, Woodrow Wilson School. 1995. 123p.

Fleming, G. J., Heard D.J., Francis, F. R., Riggs A., 2003. Evaluation of propofol and medetomidine–ketamine for short-term immobilization of gulf of mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). J Zoo Wildlife Med 34, 153–158.

Fujimoto, R. Y., Pereira, D. M., Silva, J. C., Oliveira, L. C. A. O., Inoue, L. A. K. A., Hamoy, M., Mello, V. J., Torres, M. F., Barbas, L. A. L., 2017. Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. Fish Physiol Biochem 44, 245–256 <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>

Gilderhus, P. A., Marking, L. L., 1987. Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries and Management 7:288-292.

Gonçalves, A. F. N., Santos, E. C. C., Fernandes, J. B. K., Takahashi, L. S., 2008. Menthol and eugenol as benzocaine substitutes in anesthetic induction of pacu juveniles. Acta Scientiarum Animal Sciences 30:339-344.

Ganong, W. F. 2003. Review of medical physiology. 21a edition, San Francisco: McGraw-Hill, (726p).

Gholipour K. H., Ahadzadeh, S., 2013. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. Springerplus. 2, 76.

Gonçalves, A. F. N., Santos, E. C. C., Fernandes, J. B. K., Takahashi, L. S., 2008. Menthol and eugenol as benzocaine substitutes in anesthetic induction of pacu juveniles. Acta Scientiarum Animal Sciences 30, 339–344.

Guimarães, J.I., Moffa, P.J., Uchida, A.H., Barbosa, P.B., 2003. "Normatização dos Equipamentos e Técnicas para a Realização de Exames de Eletrocardiografia e

Eletrcardiografia de Alta Resolução", Arquivos Brasileiros de Cardiologia 80, 225–234.

Hajek, G. J., Klyszejko, B., Dziaman, R., 2006. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyol Piscat 36, 93–97.

Hart, L.B., Leedy, M. G., 1985. Analysis of the catnip reaction: Mediation by olfactory system, not vomeronasal organ. Behavioral and neural biology 44, 38–46.

Hatch, R.C. Effect of drugs on Catnip (*Nepeta cataria*): Induced Pleasure Behavior in cats.

Am J Vet Res, v.33, n.01, 1972, p.143-155.

Heo, G. J., Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). Veterinary Anaesthesia and Analgesia 37:132-135.

Huang, W., Hsieh, Y., Chen, I., Wang, C. 2010. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. Zebrafish 7, 297–304.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária nacional. IBGE/CDDI/Ger. de Biblioteca e Acervos Especiais CDU 31:338.45(81) RJ. 2014

Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., Eliassen, R. A., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S (TM) and Benzoak (R) as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture 221, 549–566.

Jackson, B., Reed A., 1969. Catnip and the alteration of consciousness. Jama 207, (1349–1350p).

Junior, H. M. Caracterização da piscicultura do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e dos seus efluentes na despesca: subsídios para a implementação das boas práticas de manejo da piscicultura no município de Rio preto da Eva/AM. 2009. 202p. Tese (Doutorado em Biologia da Água Doce e Pesca Interior) – Universidade Federal do Amazonas/ INPA. Amazonas, Manaus, 2009. Disponível em: [http://tede.inpa.gov.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=611](http://tede.inpa.gov.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=611)>. Acesso em: 21 nov. 2016.

Kiessling, A. Johansson, D. Zah, I. H. Samuelson, O. B., 2009. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. Aquaculture. 286, 301–308.

King, W.V., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., Berlinsky, D., 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and PE for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquac. Res.* 36, 1442–1449.

Kubitza, F. Tambaqui, alimentando com eficiência para reduzir custos. *Panorama da Aquicultura, Tocantins*, n. 129, v. 22, p. 1-7, jan./fev. 2012.

Macleon R.A, Harms C.A, Braun-Mcneill J., 2008. Propofol anesthesia in loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *J. Wildl Dis.* 44, 143–150

Mairesse, M., 1981. *Health Secrets of Medicinal Herbs*. Arco Publishing, New York, (28p).

Marking, L.L., Meyer F.P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10, 2–5.

Melo, L. A. S.; Izel, A. C. U.; Rodrigues, F. M. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/ barragens no Estado do Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 30 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 18).

Miller, S.M., Mitchell, M.A., Heatley, J.J., Wolf, T., Lapuz, F. and Smith, J.A., 2005. Clinical and cardiorespiratory effects of propofol in the spotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). *J. Zoo Wild Anim. Med.* 36, 673–676. doi:10.1638/04034.1

Micelli, N. et al., 2005. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 261–266.

Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246, 467–481.

Neiffer D. L., Stamper, M. A., 2009. Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 50:343-360.

Nunes, E. S. S.; Cavero, B. A. S.; Pereira-filho, M.; Roubach, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 1, p. 139-143, jan. 2006.

Osterhoudt, K.C.; Lee, S.K.; Henretig, F.M., 1997. Catnip and the alteration of human Consciousness, *Vet Hum Toxicol* 39, 373–375.



Park, M. O., Hur, W. J., Im, S. Y., Seol, D. W., Lee J., Park, I. S. 2008. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research* 39:877-884.

Parodi, T. V., Cunha M. A., Heldwein, C. G., De Souza, D. M., Martins, Á. C., Garcia L. O., Wasielesky, W. Jr., Monserrat J. M., Schmidt, D., Caron, B. O., Heinzmann, B., Baldisserotto, B., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 155:462-8.

Pinto, L. C. *Neurofisiologia Clínica: Princípios Básicos e Aplicações/ Luiz Carlos Pinto – São Paulo. EditoraAtheneu, 2006.*

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* 31:309-314.

Pineda, R., Beattie, C.E., Hall, C.W., 2011. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylentetrazole seizures. *J Neurosci Methods* 200, 8–20.

Quesada R.J, Smith C.D, Heard DJ. 2011. Evaluation of parenteral drugs for anesthesia in the blue crab (*Callinectes sapidus*). *J Zoo Wildl Med.* 42, 295–299.

Randall, D.J. 1970. The circulatory system. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology. The Nervous System. Circulation and Respiration*, vol. 4 Academic Press, New York and London (532p).

Ribeiro, L. C., *Investigação ictiotóxica do extrato etanólico da raiz de spilantes acmella (jambú) em zebrafish através de análise eletrofisiológica ecomportamental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Instituto de ciências Biológicas. 61p.*

Ricchi, E.L. *Avaliação dos possíveis efeitos antinociceptivos do óleo essencial de Nepeta cataria (catnip) em camundongos. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2006.*

Ross, L. G., Ross, B., 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals.* Oxford, UK, Blackwell Publishing (222p.)

Roubach, R., Gomes, L. C., Fonseca, F. A. L., Val, A. L., 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac. Res.* 36, 1056–1061.

Rosa, I. G. Detecção automática de contração muscular utilizando a eletromiografia de superfície. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Ruffino, L. M. Gestão do uso dos recursos pesqueiros na Amazônia. Manaus: IBAMA, 2005. 135 p.

Santos, G. M.; Efrem, J. G. F.; Jansen, A. S. Peixes comerciais de Manaus. Characiformes. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006 v. 4, p. 31. Disponível em: [http://www.zoologia.ufam.edu.br/Vertebrados%20I%202011/Peixes\\_comerciais\\_de\\_Manus4.pdf](http://www.zoologia.ufam.edu.br/Vertebrados%20I%202011/Peixes_comerciais_de_Manus4.pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2016.

Sandblom, E., Seth, H., Sundh, H., Sundell, K., Axelsson, M., Kiessling, A., 2013. Stress responses in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) during hyperoxic carbon dioxide immobilization relevant to aquaculture. *Aquaculture* 414–415, 254–259.

Scorvo-Filho, J.D. Panorama da Aqüicultura Nacional. In: Informes Técnicos – Associação Catarinense de Aqüicultura, 2003. Disponível em: [http://www.acaq.org.br/arquivos/Panorama\\_aquicultura\\_nacional.PDF](http://www.acaq.org.br/arquivos/Panorama_aquicultura_nacional.PDF). Acesso em: 18 mai. 2007.

Sarkar, M.; Rashmi, R.; V.; Varma, P. N., 1995. Pharmacognosy of *Nepeta cataria*, Homoeopathic Pharmacopoea Laboratory, C.G.O. Complex – I, Kamla Nehru Nagar, Ghaziabad – 201 002, India 23, 225–234.

Seth, H., Axelsson, M., Sundh, H., Sundell, K., Kiessling, A., Sandblom, E., 2013. Physiological responses and welfare implications of rapid hypothermia and immobilisation with high levels of CO<sub>2</sub> at two temperatures in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 402–403, 146–151.

Sherry, C.J.; Hunter, P.S., 1979. The effect of an ethanol extract of catnip (*Nepeta cataria*) on the behavior of the young chick. *Experientia* 35, 237–238.

Silva, L. L., Parodi, T. V., Reckziegel, P., Garcia, V. O., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., Malmann, C. A., Pereira, A. M. S., Heinzmann, B. M., 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 350, 91–97.

Silva, A. M. D.; Gomes, L. C.; Roubach, R. Growth, yield, water and effluent quality in ponds with different management during tambaqui juvenile production. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 42, n. 5, p. 733-740, maio 2007.

Sladky K.K., Swanson C.R., Stoskopf M.K., Loomis M.R., Lewbart G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337–342.

Smitherman, L.C., Janisse, J., Mathur A., 2005. The use folk remedies among children in an urban black community: remedies for fever, colic, and teething. *Pediatrics* 115, 297–304,

Sneddon, L. U., 2012. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *Journal of Exotic Pet Medicine* 21, 32–43.

Sousa R. G. C., Prado G. F., Pyñeiro J. I. G., Neto E. B. B., 2016. Avaliação do ganho de peso do tambaqui cultivado com diferentes taxas de proteínas na alimentação. *Biota Amazônia* 6, 40–45.

Souza, R.A. De; Padua, D.M.C.; Oliveira, R.P. De C.; Maia, T.C.B. Análise econômica da criação de tambaqui em tanques-rede: estudo de caso em assentamento da reforma agrária. *Custos e a@ronegocio on line* - v. 10, n. 1 – Jan-Mar - 2014. ISSN 1808-2882

Svoboda, M., Kolarova, J. A survey of anaesthetics used in the fish farming. *Health Protection of Fish - Proceeding of Papers. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodňany.* 1999. p. 49–72.

Summerfelt, R.C.; Smith, L.S., 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. Em: Schrek, C.B., Moyle, P.B. *Methods for fish biology*, American Fishery Society, Cap. 8, p. 684.

Thurmon, J. C.; Tranquilli, W. J.; Benson, G. J. Anesthesia of wild, exotic, and laboratory animals. In: Thurmon, J. C. Lumb & Jones *veterinary anesthesia*. 3.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p.686-735

Unesco. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. *Manual and Guides 12*, Intergovernmental Oceanographic Commissiony. Paris, France, (56p).

Valença-Silva G, Braz M.G, Barreto R.E, Salvadori D.M.F., 2014. Low dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile tilapia. *Journal Transactions of the American Fisheries Society* 143, 414–419.

Valentim, A. M., Félix, L. M., Carvalho, L., Diniz, E., Antunes, L. M., 2016. A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine. *PLoS ONE* 11, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0147747

Velíšek, J.; Vlastimil, S.; Kouřil, J.; Svobodová, Z. 2009. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquac. Res.* 40, 354–361.

Valladão, G., Gallani, S. U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 0, 1–9.

Walsh, C. T., Pease, B. C., 2002. The use of clove oil as an anaesthetic for the long finned eel, *Anguilla reinhardtii* (Staindachener). *Aquac. Res.* 33, 627–635.

Weber, E. S. 3<sup>rd</sup>., 2011. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice Journal* 14, 21–32.

Weber III, E. S., 2011. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice Journal* 14:21-32.

Webb C. E.; Russell R. C., 2007. Is the extract from the plant catmint (*Nepeta cataria*) repellent to mosquitoes in Australia? *Journal of the American Mosquito Control Association* 23, 351–354.

Webster J. G., 1978. *Biomedical Instrumentation*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, (58p).

Webster J. G., 1988. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, (3022p).

Williams e Wilkins Company, 1982. *Stedman's medical dictionary*, 24th edition. Baltimore, Maryland, em Summerfelt, R.C.; Smith, L.S. Anaesthesia, surgery and related techniques. Em: Schrek, C.B., Moyle, P.B. methods for fish biology, cap 8, American Fishery Society, n. 684 p., 1990.