



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAqui



**AVALIAÇÃO ANESTÉSICA DO GERANIOL E CITRONELOL PARA TAMBAQUI,  
*Colossoma macropomum*: IMPLICAÇÕES NEUROMUSCULARES,  
CARDIORRESPIRATÓRIAS E QUIMIOPROTETIVAS**

EDNARA RONISE LIMA DE ARAÚJO

RIO GRANDE – RS

Agosto, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
INSTITUTO DE OCEANOGRAPHIA – IO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAqui

**AVALIAÇÃO ANESTÉSICA DO GERANIOL E CITRONELOL PARA TAMBAQUI,  
*Colossoma macropomum*: IMPLICAÇÕES NEUROMUSCULARES,  
CARDIORRESPIRATÓRIAS E QUIMIOPROTETIVAS**

Ednara Ronise Lima de Araújo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Aquicultura da Universidade Federal do Rio  
Grande – FURG, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio (FURG)  
Co-orientador: Prof. Dr. Luis André Barbas (IFPA – *Campus* Castanhal)

RIO GRANDE – RS  
Agosto, 2022

#### Ficha Catalográfica

A663a Araújo, Ednara Ronise Lima de.  
Avaliação anestésica do geraniol e citronelol para tambaqui,  
*Colossoma macropomum*: implicações neuromusculares,  
cardiorrespiratórias e quimioprotetivas / Ednara Ronise Lima de  
Araújo. – 2022.  
122 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande –  
FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS,  
2022.  
Orientador: Dr. Luís André Sampaio.  
Coorientador: Dr. Luis André Barbas.

1. Fitoconstituintes 2. Eletrofisiologia 3. EMG 4. ECG 5. FR 6. OBI  
7. EEG 8. Estresse oxidativo 9. EROs 10. Transporte 11. Sedação  
I. Sampaio, Luís André II. Barbas, Luis André III. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 04/2022

**DE DEFESA DA 75ª TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA DE DEFESA**

No dia vinte e seis de agosto de dois mil e vinte e dois, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, da **EDNARA RONISE LIMA DE ARAÚJO**, orientada pelo Prof. Dr. Luís André Nassr de Sampaio e co-orientada pelo Prof. Dr. Luis André Luz Barbas, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Luís André Nassr de Sampaio (Orientador – IO/FURG), Prof. Dr. Luis André Luz Barbas (Co-orientador – IFPA), Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia (IO/FURG), Prof.ª Dr.ª Micheli Rosa de Castro (FURG) e Prof. Dr. Moisés Hamoy (UFPA). Título da Tese: “**AVALIAÇÃO ANESTÉSICA DO GERANIOLO E CITRONELOL PARA TAMBACUI, Colossoma macropomum: IMPLICAÇÕES NEUROMUSCULARES, CARDIORRESPIRATÓRIAS E QUIMIOPROTETIVAS**”. Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq, Prof. Dr. Dariano Krummenauer passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luís André Nassr de Sampaio, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **EDNARA RONISE LIMA DE ARAÚJO** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva de a Tese ser entregue na Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pela candidata e pelo Coordenador do PPGAq.

  
**PROF. DR. LUÍS ANDRÉ NASSR DE SAMPAIO (ORIENTADOR – IO/FURG)**

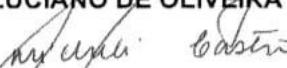
2022.08.26 21:24:02

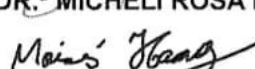
-03'00"

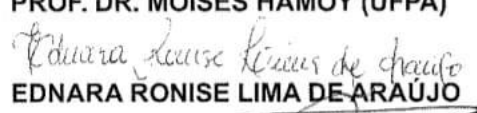
2022.002.20191

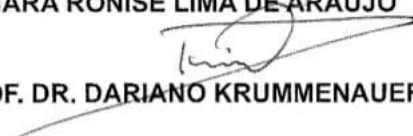
  
**PROF. DR. LUIS ANDRÉ LUZ BARBAS (IFPA)**

  
**PROF. DR. LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA (IO/FURG)**

  
**PROF.ª DR.ª MICHELI ROSA DE CASTRO (FURG)**

  
**PROF. DR. MOISÉS HAMOY (UFPA)**

  
**EDNARA RONISE LIMA DE ARAÚJO**

  
**PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (Coordenador do PPGAqui)**

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- Figure 1 – Trends of induction (A3) and recovery (R2) in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum* exposed to short-term baths with increasing concentrations of geraniol (A) e citronellol (B).....52
- Figure 2 – Electromyographic records (EMG) of tambaqui, *Colossoma macropomum* in the basal state (A and B); submitted to short-term baths with geraniol (GRL) at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  (C and D), citronellol (CTL) at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  (E and F) and during recovery after anaesthesia with GRL (G and H) and CTL (I and J). Recordings were performed for 300 s. A colorimetric scale is used in the frequency spectrograms whereby the reddish colours indicate a more intense electrical signal over time and across different frequencies.....53
- Figure 3 – Mean amplitudes recorded in the electromyogram (EMG) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings performed for 300 s in the controls, fish undergoing anaesthetic baths with GRL at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CTL at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  and in recovery post-anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). The Ind I and Ind II periods correspond to the mean amplitude within standardized intervals from 1 to 150 s and 150 to 300 s, respectively. \*\*\* Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind I to control; +++ Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind II to Ind I within the same anaesthetic; ° Indicates significant differences (°,  $p < 0.05$ ; °°,  $p < 0.001$ ) in Recovery compared to Ind II relative to the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].....54
- Figure 4 – Opercular beat intensity (OBI) records of tambaqui, *Colossoma macropomum* in the basal state (A and B), submitted to baths with geraniol (GRL) at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  (C and D) and citronellol (CTL) at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  (E and F) and during recovery after anaesthesia with GRL (G and H) and CTL (I and J). Recordings were performed for 300 s. A colorimetric scale is used in the frequency spectrograms whereby the

reddish colours indicate a more intense electrical signal over time and across different frequencies.....56

Figure 5 – Record of mean amplitude of opercular beat intensity (OBI) (A) and opercular beat rate (OBR), in beats per minute (bpm) (B) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings made in 300 s in the controls, fish submitted to anaesthetic baths with GRL at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CTL at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  and during recovery after anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). The Ind I and Ind II periods correspond to the average amplitude of standardized intervals from 1 to 150 s and 150 to 300 s, respectively. \* Indicates significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ) from Ind I to control; +++ Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind II to Ind I within the same anaesthetic; <sup>ooo</sup> Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) of Recovery in relation to Ind II within the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )]......57

Figure 6 – Normal electrocardiographic (ECG) tracings of tambaqui *Colossoma macropomum* (10 s) (A) and 2-s snapshots showing the P and T waves, and the QRS complex (B); and fish undergoing short-term baths with geraniol (GRL) at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  (C and D) and during recovery after anaesthesia (E and F), citronellol (CTL) at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  (G and H) and during recovery after anaesthesia (I and J). Recordings were all performed for 300 s (left panels) showing 10-s fragment amplifications (right panels except for B panel).....58

Figure 7 – Heart rate (HR), in beats per minute (bpm) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings made in 300 s in the controls, fish submitted to anaesthetic baths with GRL at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Ind GRL), CTL at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Ind CTL) and during recovery post anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). \*\*\* Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) of Induction relative to the control; <sup>ooo</sup> Indicates significant differences (<sup>ooo</sup>,  $p < 0.001$ ) of Recovery in relation to Induction within the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )]......59

## ARTIGO 2

- Figure 1 – Normal electrocardiographic (ECG) recording of Tambaqui, *Colossoma macropomum* in the Basal group with sinus rhythm in 10s (A) and 2s amplification demonstrating P, T waves, duration of RR and QT intervals and QRS complex amplitude (B).....74
- Figure 2 – Electrocardiographic (ECG) recording of Tambaqui, *Colossoma macropomum* during contact with Ethanol (A), and 2s amplification demonstrating P, T waves, duration of RR and QT intervals and QRS complex amplitude (B).....74
- Figure 3 – Electrocardiographic recording (ECG) of Tambaqui, *Colossoma macropomum* upon contact with Geraniol (GRL) 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$ , with a total duration of 5 minutes, the red line indicates the tracing that was evaluated with magnification of the last 150 seconds of exposure with either substance and 2-second magnification of the tracing demonstrating the ECG components.....75
- Figure 4 – Mean values recorded in the control group, vehicle control (ethanol), (GRL) 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  in juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum* during 5 minutes of induction, showing comparisons between means of electrocardiographic heart rate (beats  $\text{min}^{-1}$ ) recordings (A) ; Amplitude averages (mV) (B); Comparison between R-R interval means (seconds) (C); Evaluation of Q-T interval means (seconds) (D); Evaluation of the average duration of the QRS complex (seconds) (E). \*\*\* indicates statistical difference for the control; ### indicates statistical difference for the control group Ethanol; +++ Indicates statistical difference for the geraniol group. [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].....76
- Figure 5 – Electrocardiographic recording (ECG) of Tambaqui, *Colossoma macropomum* in 5-min recovery after (GRL) 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  exposure. The red line indicates magnification of the last 150 seconds of exposure with the substances and 2-second magnification of the tracing demonstrating the ECG components.....77

Figure 6 – Mean values recorded in the control group, vehicle control (Ethanol), (GRL) 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  in juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum* during 5 minutes in recovery. Comparisons were made between means of electrocardiographic heart rate (beats  $\text{min}^{-1}$ ) recordings (A); Amplitude averages (mV) (B); Comparison between R-R interval means (seconds) (C); Evaluation of Q-T interval means (Seconds) (D); Evaluation of the average duration of the QRS complex (seconds) (E). \*\*\* Indicates statistical difference from the controls; ### Indicates statistical differences from the Ethanol control group; +++ Indicates statistical difference from the geraniol group. [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].....78

### ARTIGO 3

Figure 1 – Tambaqui *C. macropomum* midbrain electroencephalographic (EEG) records. (A) Control basal records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B) Ethanol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.....90

Figure 2 – Electroencephalographic (EEG) recordings of the Tambaqui *C. macropomum* midbrain during induction. (A)  $\mu\text{L L}^{-1}$  Geraniol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  Citronellol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.....91

Figure 3 – Electroencephalographic (EEG) recordings of the Tambaqui *C. macropomum* midbrain during recovery. (A) Geraniol (GRL) records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B) Citronellol (CTL) records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.....92

Figure 4 – Power spectral density (PSD) of frequencies up to 40 Hz in Tambaqui *C. macropomum* compared with the power averages from the basal control, during geraniol induction (GRL –  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) and recovery compared with the power averages of the baseline control (A); and during citronellol induction (CTL –  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ ) and recovery (B); Means of linear power between basal control, ethanol, geraniol induction (GRL – Ind), citronellol induction (CTL – Ind), geraniol recovery (GRL – Rec) and citronellol recovery (CTL – Rec) groups. \* indicates statistical differences from the control group; ^ indicates statistical differences from the GRL – Ind group; # indicates statistical differences from the CTL – Ind group; + indicates statistical differences from the CTL – Rec group. (After ANOVA followed by Tukey's test). (\*)  $P<0.01$ ; (\*\*)  $P<0.001$ ; (\*\*\*)  $P<0.0001$ .(n=9).....93

Figure 5 – Power spectral density (PSD) of frequencies up to 40 Hz in Tambaqui *C. macropomum* compared for the last 30 seconds of the recordings (30 s), total time induction for geraniol (GRL –  $70 \mu\text{L L}^{-1}$ ) (A); and total time induction for citronellol (CTL –  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ ) (B); Means of linear power between groups of basal control, ethanol, geraniol induction (GRL – Ind), citronellol induction (CTL – Ind), geraniol recovery (GRL – Rec) and citronellol recovery (CTL – Rec) (C ). \* indicates statistical differences from the control group; + indicates statistical differences from the GRL group; # indicates statistical differences from the CTL group; ^ indicates statistical difference for the CTL group – 30 s (C). (After ANOVA followed by Tukey). (\*)  $P<0.01$ ; (\*\*)  $P<0.001$ ; (\*\*\*)  $P<0.0001$ , (n=9).....94

#### ARTIGO 4

Figura 1 – Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil nas Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado(C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempo (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas na mesma linha, indicam deferenças significativas dentro do mesmo

anestésicos em tempos diferentes. (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).....107

Figura 2 – Teor de substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARS) Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado(C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempo (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas na mesma linha, indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésicos em tempos diferentes. Asterísco indicam diferenças em relação ao tempo zero (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).....108

Figura 3 – Determinação da atividade de GSH nas Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado(C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempo (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas na mesma linha, indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésicos em tempos diferentes. Asterísco indicam diferenças em relação ao tempo zero (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).....109

Figura 4 – Determinação do teor de grupos sulfidríla associados à proteína (P-SH) em Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado(C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempo (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas na mesma linha, indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésicos em tempos diferentes. Asterísco indicam diferenças em relação ao tempo zero (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).....111

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 – Latencies to induction and recovery stages (seconds $\pm$ SD) in tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> juveniles exposed to anaesthetic concentrations of geraniol (GRL) and citronellol (CTL)..... | 50 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### ARTIGO 4

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 – Médias $\pm$ desvio padrão (DP) dos parâmetros de qualidade da água antes e após transporte de juvenis de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> , em diferentes tempos (2, 6 e 10 hoas) com adição ou de não Geraniol (10,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol (13,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ )..... | 106 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|                   |                                                                  |
|-------------------|------------------------------------------------------------------|
| ACAP              | Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil            |
| ANOVA             | Análise de Variância                                             |
| ATP               | Adenosina trifosfato                                             |
| Ca <sup>2+</sup>  | Cálcio                                                           |
| CaCO <sub>3</sub> | Carbonato de cálcio                                              |
| CEUA              | Comitê de Ética no Uso de Animais                                |
| Cl <sup>-</sup>   | Cloreto                                                          |
| CNS               | Central nervous system                                           |
| CP                | Crude protein                                                    |
| CRT               | Controle                                                         |
| CTL               | Citronelol                                                       |
| DO                | Dissolved oxygen                                                 |
| ECG               | Eletrocardiograma                                                |
| EDTA              | Ethylenediaminetetraacetic acid                                  |
| EEG               | Eletroencefalograma                                              |
| EMG               | Eletromiograma                                                   |
| EO                | Essential oils                                                   |
| EROs              | Espécies reativas de oxigênio                                    |
| ETN               | Etanol                                                           |
| FAO               | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| FC                | Frequência cardíaca                                              |
| FR                | Frequência respiratória                                          |
| GABA <sub>A</sub> | Ácido gama-aminobutírico tipo A                                  |
| GRL               | Geraniol                                                         |
| GSH               | Glutathione                                                      |
| GSSG              | Glutathione oxidada                                              |
| HR                | Heart rate                                                       |
| IBGE              | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                  |
| IFPA              | Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará      |
| Ind CTL           | Indução com Citronelol                                           |
| Ind GRL           | Indução com Geraniol                                             |

|                       |                                              |
|-----------------------|----------------------------------------------|
| Ind I <sub>CTL</sub>  | Primeira parte da indução com Citronelol     |
| Ind I <sub>GRL</sub>  | Primeira parte da indução com Geraniol       |
| Ind II <sub>CTL</sub> | Segunda parte da indução com Citronelol      |
| Ind II <sub>GRL</sub> | Segunda parte da indução com Geraniol        |
| K <sup>+</sup>        | Potássio                                     |
| LPO                   | Lipoperoxidação                              |
| MDA                   | Malondealdeído                               |
| MS-222                | Tricaína metano sulfonato                    |
| Na <sup>+</sup>       | Sódio                                        |
| NaCl                  | Cloreto de sódio                             |
| NMDA                  | N-metil D-Aspartato                          |
| N-NH <sub>3</sub>     | Nitrogênio de amônia                         |
| N-NO <sub>2</sub>     | Nitrogênio de nitrito                        |
| NPSH                  | Tióis não-proteicos                          |
| OBI                   | Opercular beat intensity                     |
| OBR                   | Opercular beat rate                          |
| OD                    | Oxigênio dissolvido                          |
| OE                    | Óleo essencial                               |
| PB                    | Proteína Bruta                               |
| PDS                   | Power spectral distribution                  |
| pH                    | Potencial Hidrogeniônico                     |
| P-SH                  | Tióis proteicos                              |
| QRS                   | Complexo formado pelas Ondas Q, R e S        |
| Q-T                   | Intervalo entre as ondas Q e T               |
| REC <sub>CTL</sub>    | Recuperação após exposição ao Citronelol     |
| REC <sub>GRL</sub>    | Recuperação após exposição ao Geraniol       |
| ROS                   | Reactive oxygen species                      |
| R-R                   | Intervalo entre duas ondas R                 |
| SH                    | Grupamento tiol                              |
| SNC                   | Sistema Nervoso Central                      |
| TAN                   | Total ammonia nitrogen                       |
| TBARS                 | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCA                   | Ácido Tricarboxílico                         |
| UFPA                  | Universidade Federal do Pará                 |

## ÍNDICE

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| EPÍGRAFE.....                                                           | XVI |
| DEDICATÓRIA.....                                                        | 17  |
| AGRADECIMENTOS.....                                                     | 18  |
| RESUMO GERAL.....                                                       | 20  |
| ABSTRACT.....                                                           | 22  |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                               | 24  |
| 2. EMBASAMENTO TEÓRICO .....                                            | 27  |
| 2.1 Anestésicos na Aquicultura .....                                    | 27  |
| 2.1.1 Anestesia e Sedação .....                                         | 28  |
| 2.1.2 Transporte .....                                                  | 29  |
| 2.1.3 Uso de extrativos vegetais.....                                   | 30  |
| 2.2 Marcadores Biológicos .....                                         | 32  |
| 2.2.1 Indicadores Eletrofisiológicos .....                              | 32  |
| 2.2.2 Bioquímico: Estresse Oxidativo .....                              | 33  |
| 2.3 Modelo Experimental: Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) ..... | 35  |
| 3. OBJETIVO GERAL.....                                                  | 35  |
| 3.1 Objetivos específicos .....                                         | 36  |
| 4. REFERÊNCIAS .....                                                    | 36  |
| CAPÍTULO 1 .....                                                        | 46  |
| Abstract .....                                                          | 47  |
| 1. INTRODUCTION.....                                                    | 47  |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....                                            | 50  |
| 2.1 Acquisition of the plant constituents.....                          | 50  |
| 2.2 Animals and acclimation period.....                                 | 50  |
| 2.3 Experiment I: Behavioural Assessment .....                          | 51  |
| 2.4 Experiment II: Electrophysiological Characterization .....          | 51  |
| 2.5 Statistical analyses .....                                          | 52  |
| 3. RESULTS.....                                                         | 53  |
| 3.1 Behavioural assessment.....                                         | 53  |
| 3.2 Electrophysiological responses .....                                | 54  |
| 3.2.1 Electromyography (EMG).....                                       | 54  |
| 3.2.2 Opercular Beat Intensity (OBI) and Opercular Beat Rate (OBR)..... | 57  |
| 3.2.3 Electrocardiographic recordings (ECG) .....                       | 59  |
| 4. DISCUSSION.....                                                      | 61  |
| 5. CONCLUSION .....                                                     | 65  |
| REFERENCES.....                                                         | 66  |
| CAPÍTULO 2 .....                                                        | 70  |
| Abstract .....                                                          | 71  |
| 1. INTRODUCTION.....                                                    | 71  |
| 2. MATERIAL AND METHODS.....                                            | 73  |
| 2.1 Animals and acclimation period.....                                 | 73  |
| 2.2 Anaesthetic preparation and conservation.....                       | 74  |
| 2.3 Experimental Design .....                                           | 74  |
| 2.3.1 Electrocardiogram (ECG) Recordings and Analyses .....             | 74  |
| 2.4 Statistical analyses .....                                          | 75  |
| 3. RESULTS.....                                                         | 75  |
| 3.1 Electrocardiogram (ECG) and Heart Rate (HR) during induction .....  | 75  |

|       |                                                                                                                      |     |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2   | <i>Electrocardiogram (ECG) and Heart Rate (HR) during recovery.....</i>                                              | 79  |
| 4.    | DISCUSSION.....                                                                                                      | 81  |
|       | REFERENCES.....                                                                                                      | 84  |
|       | CAPÍTULO 3.....                                                                                                      | 89  |
|       | Abstract .....                                                                                                       | 90  |
| 1.    | INTRODUCTION.....                                                                                                    | 90  |
| 2.    | MATERIAL AND METHODS.....                                                                                            | 92  |
| 2.1   | <i>Experimental Animals.....</i>                                                                                     | 92  |
| 2.2   | <i>Experimental Design .....</i>                                                                                     | 92  |
| 2.3   | <i>Implantation of electrodes and acquisition of electroencephalographic recordings</i>                              | 92  |
| 2.4   | <i>Signal analysis and statistics .....</i>                                                                          | 93  |
| 3.    | RESULTS.....                                                                                                         | 93  |
| 4.    | DISCUSSION.....                                                                                                      | 98  |
|       | REFERENCES.....                                                                                                      | 99  |
|       | CAPÍTULO 4.....                                                                                                      | 102 |
|       | RESUMO .....                                                                                                         | 102 |
| 1.    | INTRODUÇÃO.....                                                                                                      | 103 |
| 2.    | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                              | 105 |
| 2.1   | <i>Aquisição dos animais e aclimação .....</i>                                                                       | 105 |
| 2.2   | <i>Delineamento experimental .....</i>                                                                               | 105 |
| 2.3   | <i>Análises dos parâmetros de qualidade da água .....</i>                                                            | 106 |
| 2.4   | <i>Análises dos Parâmetros de Estresse Oxidativo .....</i>                                                           | 106 |
| 2.4.1 | <i>Coleta e Preparação de Tecidos .....</i>                                                                          | 106 |
| 2.4.2 | <i>Proteínas totais .....</i>                                                                                        | 106 |
| 2.4.3 | <i>Capacidade Antioxidante Total contra radicais peroxil (ACAP) .....</i>                                            | 106 |
| 2.4.4 | <i>Concentração do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e níveis de grupos sulfidrilas proteicos (P-SH) .....</i> | 107 |
| 2.4.5 | <i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....</i>                                                    | 107 |
| 2.5   | <i>Análises estatística .....</i>                                                                                    | 108 |
| 3.    | RESULTADOS .....                                                                                                     | 108 |
| 3.1   | <i>Avaliação dos parâmetros de qualidade da água .....</i>                                                           | 108 |
| 3.2   | <i>Capacidade Antioxidante Total contra radicais peroxil (ACAP) .....</i>                                            | 109 |
| 3.3   | <i>Concentração do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e níveis de grupos sulfidrilas proteicos (P-SH) .....</i> | 111 |
| 3.4   | <i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>                                                     | 113 |
| 4.    | DISCUSSÃO.....                                                                                                       | 114 |
|       | REFERÊNCIAS.....                                                                                                     | 117 |
| 5.    | CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                                           | 120 |
| 6.    | CONCLUSÕES.....                                                                                                      | 121 |

## EPÍGRAFE

“Na vida só vale o amor e a amizade. O resto  
é tudo pinóia, é tudo presunção, não paga a  
pena”  
(*Jorge Amado*)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha querida avó Cecília Lima (*in memoriam*), mulher forte e guerreira que sempre ajudou sem distinção, principalmente, aqueles que mais precisavam. Mostrou com atitudes que a gente pode fazer diferença na vida de uma pessoa e de uma comunidade inteira. Saudades eternas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela força e pela fé que me sustentaram a cada dia, por ter sido meu refúgio quando eu mais precisei, por me acolher quando eu nem sei se merecia, e por permitir que eu concluísse essa última etapa da minha vida profissional.

Aos meus pais, Edmilson João Abreu de Araújo e Rosângela da Silva Lima que tanto amo, por serem exemplos de gratidão, amor e humildade. Escolheria mil vezes vocês. Aos meus irmãos e sobrinhos por sempre serem meu porto seguro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís André de Sampaio, pela oportunidade concedida para orientação, pelo apoio infraestrutural e logístico no desenvolvimento dos trabalhos e por toda a flexibilidade concedida na reorganização desta pesquisa e prazos para finalização dos trabalhos em tempos difíceis de pandemia.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luis André Luz Barbas, pela amizade e confiança, e pela contribuição em minha formação profissional e pessoal em todos esses anos. Principalmente pelos conselhos, correções, sugestões e paciência na execução e condução desse trabalho. Pelo conhecimento compartilhado.

Ao Laboratório de Aquacultura de Espécies Tropicais (LAET) do IFPA – Castanhal, que desde a minha graduação tem sido meu ponto de apoio e dessa vez, mais do que nunca. Foi onde fiz acontecer tudo o que realizei nesses 4 anos. Agradeço também ao Prof. Dr. Marcelo Ferreira Torres pela amizade, ajuda e conselhos. Aos estagiários pela colaboração durante os experimentos, sem eles seria uma atividade quase impossível de se realizar.

Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais (LFTPN) da UFPA – Belém, principalmente ao Prof. Dr. Moisés Hamoy, por todo o aprendizado, disponibilidade e orientação nas análises que possibilitaram a concretização da maior parte desse trabalho de tese.

Ao BIFOA e à toda equipe, principalmente ao Prof. Dr. José Monserrat, que me acolheram inicialmente, e onde pude executar parte da minha tese.

Ao LAPEM e à toda equipe do laboratório, pela acolhida nesses 4 anos de doutorado, pelas trocas e momentos de descontração e trabalhos compartilhados.

Ao IFPA – Campus Castanhal, principalmente aos Prof Me. Roberto Dias (*in memoriam*) e ao Prof. Dr. Adebaro Reis, pela solicitude e por disponibilizarem a infraestrutura necessária para realização deste projeto.

À Micheli Castro que além da amizade me adotou como parte da família junto com a Júlia Moura e Beatriz Fillmann e desde o primeiro dia que conheci já guardei no escaninho do meu coração, onde irão permanecer pra sempre comigo. Sou tão grata por ter conhecido vocês e por ter convivido com vocês. Foram tantos momentos bons, que me fazem sorrir com o coração quando lembro, que sorte a minha.

Às grandes amizades que fiz na FURG e tenho certeza que permanecerão. Em especial àquelas que marcaram de um jeito único esses 4 anos no Cassino: Ana Paula Moraes, Anieli Maraschi, Cynthia Couto, Elisa Prates, Fabiane Serra, Flávia Banderó, Inácio Alves, Joel Linares, Joseane Marques, Lucas Maltez, Missylene Xavier, Wéllica Reis.

As minhas amigas que sempre estão comigo, apoiando e incentivando, e mesmo longe gostaríamos de estarmos perto, e quando esse dia chega, o sentimento é sempre o mesmo: Andreza Albuquerque, Bianca Pires, Brenda Maria, Denise Cunha, Elisi Monteiro, Maria Vanessa Silva, Maryjane Gomes, Nayara Olivera, Nicole Monteiro, Rose Menezes, Sriley Nascimento, Tatiane Mendes e Tatiana Monteiro.

Aos professores do PPGAqui-EMA – FURG e funcionários da Estação Marinha, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, e que estiveram sempre presentes nos bons e maus momentos, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO GERAL

O estudo de novos agentes anestésicos permitirá a proposição de fármacos alternativos que sejam eficazes, potencialmente menos onerosos, sem prescindir da segurança e eficácia necessárias, com ação rápida sobre o sistema nervoso e sem complicações posteriores para o animal. Em peixes, a atividade anestésica do óleo essencial (OE) de citronela foi comprovada, no entanto, não há informações na literatura referente a qual ou quais constituintes majoritários deste óleo seriam os responsáveis pelos efeitos biológicos e comportamentais observados em juvenis anestesiados. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia anestésica dos fitoconstituintes isolados do OE de citronela, geraniol (GRL) e citronelol (CTL) em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, através da verificação dos tempos de indução e recuperação por ensaios de concentração-resposta, além de avaliar seus efeitos sobre o comportamento, modulação do tônus muscular, frequência e ritmo cardiorrespiratórios, potencial cardiotoxico, capacidade de determinar depressão neuronal central e balanço oxidativo. Para a **avaliação da anestesia e recuperação (Capítulo 1)**, a eficácia anestésica do GRL e CTL foi através da caracterização comportamental e a avaliação de marcadores eletrofisiológicos. Os peixes ( $24,78 \pm 2,50\text{g}$ ) foram divididos em dois grupos experimentais: I – Avaliação Comportamental: Foram testadas seis concentrações (10; 30; 50; 70; 90; e  $110 \mu\text{L L}^{-1}$ ) para cada composto, onde foram encontradas as concentrações efetivas para ambos os produtos ( $70 \mu\text{L L}^{-1}$  GRL e  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  CTL). II – Caracterização Eletrofisiológica: as concentrações determinadas no primeiro experimento foram utilizadas para os registros de EMG, ECG, intensidade e frequência do batimento opercular (OBI e OBR) e frequência cardíaca (FC).

Nossos resultados demonstraram que o GRL e CTL promoveram a imobilização total do corpo, apresentaram propriedades miorelaxantes, com alterações, mas sem comprometimento da função cardíaca. Na **caracterização cardiológica e potencial cardiotoxico (Capítulo 2)**, foram avaliadas as mudanças nos padrões de resposta cardíaca dos animais expostos ao GRL e CTL e durante a recuperação. Os juvenis de tambaqui ( $13,9 \pm 1,4\text{g}$ ) foram expostos às mesmas concentrações determinadas no primeiro capítulo, e os registros eletrocardiográficos (ECG) tiveram duração de cinco minutos. Foram investigados os parâmetros frequência cardíaca (FC) (batimentos  $\text{min}^{-1}$ ), registro de amplitude ( $mV$ ), intervalo RR (s), intervalo QT (s) e duração do complexo QRS (s). Os animais expostos ao GRL apesar de apresentarem efeito cronotrópico negativo, mantiveram o ritmo sinusal. Já quando expostos ao CTL, foram observadas

1 bradicardia acentuada e arritmia, que se mostraram reversíveis quando na recuperação, que se  
2 mostrou rápida para ambos os anestésicos. Para a **avaliação da depressão neuronal (Capítulo**  
3 **3)**, a fim de observar o aprofundamento anestésico e a reversibilidade dos efeitos promovidos  
4 pelo GRL e CTL sobre o SNC, os peixes ( $35,2 \pm 9,4\text{g}$ ) foram expostos aos anestésicos e os  
5 registros de EEG de indução e recuperação foram realizados por 300 segundos. Foram  
6 observadas irregularidades nos traçados, no entanto, o GRL permitiu traçado regular, já os  
7 animais expostos ao CTL apresentarem traçados incompatíveis com uma condição de anestesia  
8 adequada. Para a **avaliação do balanço oxidativo durante o transporte em sedação**  
9 **(Capítulo 4)**, os animais ( $26,97 \pm 3,73\text{ g}$ ) foram submetidos ao transporte simulado por 2, 6 e  
10 10 horas, utilizando doses sedativas correspondendo à 15% da dose efetiva encontradas no  
11 primeiro capítulo desse trabalho (GRL –  $10,5\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$  e CTL –  $13,5\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$ ). Ao final do  
12 transporte foram avaliados a capacidade antioxidante (ACAP), concentração da glutathiona  
13 (GSH) e grupo sulfidril (P-SH) e os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) em brânquias,  
14 cérebro, fígado e músculo. Nas brânquias foram encontradas as maiores concentrações de GSH  
15 e P-SH na presença dos anestésicos. Por outro lado, os níveis de LPO foram consideravelmente  
16 maiores no músculo dos animais transportados com adição de CTL na água, independente do  
17 tempo de transporte. Concluimos que GRL adicionado à água de transporte em doses sedativas,  
18 seria uma boa opção para mitigar danos oxidativos principalmente nas brânquias. Por outro  
19 lado, o CTL demonstrou ação pró-oxidante, com altos níveis de LPO no músculo dos animais  
20 pós-transporte.

21  
22 Palavras chaves: fitoconstituintes, eletrofisiologia, EMG, ECG, FR, OBI, EEG, estresse  
23 oxidativo, EROs, transporte, sedação

## ABSTRACT

The study of new anaesthetics will allow for the proposition of alternative drugs that are effective, potentially less expensive, without giving up the necessary safety and efficacy, with rapid action on the central nervous system and without further complications to the animal. In fish, the anaesthetic activity of citronella essential oil (EO) has been proven, however, there is no information in literature on which major constituents of this oil would be responsible for the biological and behavioural effects observed in anesthetized fish. In this sense, the objective of this study was to evaluate the anaesthetic efficacy of the isolated phytoconstituents from the EO of citronella, geraniol (GRL) and citronellol (CTL) in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, through concentration-response trials during induction and recovery, in addition to evaluating its effects on behaviour, modulation of muscle tone, cardiorespiratory rate and rhythm, cardiotoxic potential, ability to determine central neuronal depression and oxidative balance. For the **assessment of anaesthesia and recovery (Chapter 1)**, the anaesthetic efficacy of GRL and CTL was assessed through behavioural characterization and the assessment of electrophysiological markers. The fish ( $24.78 \pm 2.50$  g) were divided into two experimental groups: I – Behavioural Assessment: Six concentrations were tested (10; 30; 50; 70; 90; and  $110 \mu\text{L L}^{-1}$ ) for each compound, whereby effective concentrations were found for both products ( $70 \mu\text{L L}^{-1}$  GRL and  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  CTL). II – Electrophysiological Characterization: the concentrations found in the first experiment were used to record EMG, ECG, intensity, and frequency of the opercular beat (OBI and OBR) and heart rate (HR). Our results demonstrated that GRL and CTL promoted whole body immobilization, presented myorelaxant properties, showed some alterations, but without compromise to the cardiac function. In the **Cardiological characterization and cardiotoxic potential (Chapter 2)**, changes in cardiac response patterns of animals exposed to GRL and CTL and during recovery were evaluated. Tambaqui juveniles ( $13.9 \pm 1.4$  g) were exposed to the same concentrations determined in the first chapter, and the electrocardiographic recordings (ECG) were made for five minutes. The parameters heart rate (HR) ( $\text{beats min}^{-1}$ ), amplitude of the record (mV), RR interval (s), QT interval (s) and QRS duration (s) were investigated. The animals exposed to GRL, despite having a negative chronotropic effect, maintained the sinus rhythm. When exposed to CTL, marked bradycardia and arrhythmia were observed, which proved to be reversible during recovery, which was rapid for both anaesthetics. For **neuronal depression assessment (Chapter 3)**, in order to observe the anaesthetic deepening and the reversibility of

1 the effects promoted by the GRL and CTL on the CNS, the fish ( $35.2 \pm 9.4$  g) were exposed to  
2 anaesthetics and the induction and recovery EEG recordings were performed for 300 seconds.  
3 Irregularities were observed in the tracings, however, while GRL allowed for a regular tracing,  
4 the animals exposed to CTL presented tracings incompatible with an adequate anaesthesia  
5 condition. For **oxidative balance assessment during transport in sedation (Chapter 4)**, the  
6 animals ( $26.97 \pm 3.73$  g) were submitted to simulated transport for 2, 6 and 10 hours, using  
7 sedative doses corresponding to 15% of the effective dose found in the first chapter of this study  
8 (GRL –  $10.5 \mu\text{L L}^{-1}$  and CTL –  $13.5 \mu\text{L L}^{-1}$ ). At the end of transport, antioxidant capacity  
9 (ACAP), concentration of glutathione (GSH) and sulfhydryl group (P-SH), and levels of lipid  
10 peroxidation (TBARS) in gills, brain, liver and muscle were evaluated. In gills, the highest  
11 concentrations of GSH and P-SH were found in the presence of anaesthetics. On the other hand,  
12 LPO levels were considerably higher in muscle of animals transported with the addition of CTL  
13 in water, regardless of transport time. We concluded that GRL added to the transport water in  
14 sedative doses would be a good option to mitigate oxidative damage mainly in gills whereas  
15 CTL demonstrated a pro-oxidant action, determining high levels of LPO in the muscle of fish  
16 post-transport.

17  
18 Keywords: phytoconstituents, electrophysiology, EMG, ECG, HR, OBI, EEG, oxidative stress,  
19 ROS, transport, sedation  
20  
21

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A contribuição da aquicultura para a produção global de animais aquáticos atingiu um recorde de 49,2% no ano de 2020. Mesmo com a diversidade de espécies cultiváveis, essa contribuição ainda parte de um pequeno número de espécies que dominam a produção aquícola (FAO, 2022). No Brasil, de acordo com dados do IBGE (2020), a produção total da aquicultura foi de mais de 643 mil toneladas, sendo que a produção de peixes ultrapassou 553 mil toneladas. Neste cenário, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) se manteve como a segunda espécie de peixe mais cultivada no país, atrás apenas da tilápia (*Oreochromis niloticus*), que segue como a principal espécie produzida em todas as regiões brasileiras, exceto no Norte. Vale ressaltar a elevada importância em termos de valor bruto de receita com a comercialização do tambaqui, que foi 2,4 vezes superior ao recebido pelo tilapicultor (IBGE, 2020).

Notadamente, esforços são necessários na promoção de espécies nativas de água doce como o tambaqui. Esta espécie é nativa do rio Amazonas, Orinoco e seus afluentes, sendo comum em lagos de várzea e se caracteriza por sua rusticidade, resistência a doenças e índices zootécnicos satisfatórios, atributos que foram essenciais para o aprimoramento de técnicas que viabilizassem a sua criação (Araujo-Lima e Goulding, 1998; Baldisserotto, 2018; Gomes et al., 2010).

Outras características do tambaqui também fizeram com que o mesmo fosse recentemente reforçado como um bom modelo experimental, sendo ao mesmo tempo uma espécie resistente ao manuseio e sensível a testes de avaliação da eficácia anestésica, antiestressante e antioxidante de novos produtos para uso em peixes (Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b; De Souza et al., 2018). Alguns estudos relativos à anestesia de juvenis de tambaqui já existem na literatura (Roubach e Gomes, 2001; Façanha e Gomes, 2005; Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b,c; Barbas et al., 2019; De Souza et al., 2019; Barbas et al., 2019; Barbas et al., 2021).

Considerando a necessidade de se produzir mais e de maneira mais eficiente, as práticas de manejo se intensificaram na produção aquícola, exigindo um maior controle físico dos animais durante o manuseio para a reprodução induzida, biometria e também durante o transporte. Essas práticas quando mal executadas acabam gerando estresse nos animais que pode resultar em imunossupressão, doenças e, consequentemente, mortalidades (Coyle et al., 2004; Façanha e Gomes, 2005; Ross e Ross, 2008; Vidal et al., 2008). Ademais, questões relacionadas ao bem-estar de peixes estão sendo cada vez mais amplamente discutidas, logo, a utilização de produtos anestésicos e antiestressantes para auxílio à piscicultura tem aumentado,

no intuito de reduzir os níveis de estresse, inclusive o oxidativo, ao mesmo tempo em que assegura aumento da sobrevivência, incremento da produtividade, promove bem-estar e garante respeito às questões relativas a ética animal (Sneddon, 2012).

De acordo com Sylvester (1975), um anestésico deve apresentar ação rápida sobre o sistema nervoso, sem complicações posteriores para o peixe, sendo que sua escolha, geralmente, está relacionada com a viabilidade econômica e alguns condicionantes legais. Essas substâncias se caracterizam por promoverem, de forma reversível, depressão do sistema nervoso central, miorelaxamento resultando em perda da percepção e da resposta aos estímulos ambientais. Apesar de difundido o uso de anestésicos em peixes, seus mecanismos de ação no sistema nervoso central (SNC) desses animais ainda são relativamente desconhecidos.

Neste contexto, produtos químicos como a o sulfato de quinaldina, a benzocaína e metanossulfonato de triclaína (MS-222) por muito tempo foram os mais utilizados como anestésicos para peixes, apesar dos relatos de alguns causarem efeitos indesejáveis tais como irritabilidade, perda de muco, danos às córneas e, contraditoriamente, promoverem estresse (Svoboda e Kolavora, 1999; Inoue et al., 2003; Ross e Ross, 2008; Heo e Shin, 2010; Pawar et al., 2011), com alterações metabólicas e, conseqüentemente, afetando o desempenho dos peixes.

Ainda assim, a expectativa é que o uso de anestésicos pode reduzir os danos ocasionados pelo estresse, atenuando a resposta fisiológica. Diversos indicadores têm sido validados para avaliar a intensidade do estresse, tais como os bioquímicos e fisiológicos como, os parâmetros hematológicos e de osmolaridade (Mazeaud et al., 1981; Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017b; Maltez et al., 2017; Barbas et al., 2020). No entanto, a condição anestésica ainda tem se baseado apenas na questão visual. Mais recentemente, estudos eletrofisiológicos têm sido usados para corroborar a avaliação comportamental normalmente reportada na literatura como metodologia de avaliação de anestesia e sedação em peixes (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Cantanhêde et al., 2020; De Araújo et al., 2021; Costa et al., 2022)

De acordo com Dellatre (2007), um grande número de fenômenos biológicos importantes é acompanhado de manifestações elétricas celulares associadas aos mecanismos de transporte com permeabilidade seletiva de íons ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$ ) participantes da geração do potencial de membrana nas células em geral. Esses íons fluem através de diferentes canais presentes nos seres vivos, sendo responsáveis pela transmissão elétrica em todo o sistema nervoso participando de inúmeros processos fisiológicos e bioquímicos (Mudado et al., 2003).

1 A avaliação do eletromiograma, eletroencefalograma, da frequência e ritmos  
2 cardiorrespiratórios possibilitam um entendimento mais detalhado dos fenômenos  
3 farmacológicos em animais expostos à anestésicos gerais. Para procedimentos mais invasivos  
4 como cirurgias ou eutanásia, o registro desses marcadores possibilita a avaliação dos efeitos de  
5 depressão sobre o poder de contração muscular e o sistema nervoso central, o que caracteriza  
6 em última instância, a eficácia de um produto como anestésico geral. O monitoramento  
7 cardiorrespiratório permite avaliar a compatibilidade do anestésico com a vida e os impactos  
8 envolvidos para esses sistemas orgânicos vitais (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019;  
9 Vilhena et al., 2019; De Araújo et al., 2021; Costa et al., 2022).

10 Por outra perspectiva, o estresse pode ser avaliado por indicadores bioquímicos, pela  
11 resposta de tecidos à liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a mudança do potencial  
12 redox. Quando em excesso, as ERO promovem um desequilíbrio entre os sistemas pró e  
13 antioxidantes, em que predomina o pró-oxidante, com danos celulares, quando sua acumulação  
14 vai além da capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes do organismo, resultando em uma  
15 situação de estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Bisbal et al., 2010 Lushchak, 2011;  
16 Liang et al., 2016). Nos peixes, podem determinar elevação da peroxidação lipídica no tecidos,  
17 causando danos às membranas lipídicas (Modesto e Martinez, 2010). Apesar da anestesia ser  
18 capaz, em muitos casos, de mitigar alterações bioquímicas e fisiológicas em peixes, o próprio  
19 anestésico pode, paradoxalmente, induzir efeitos que causem perturbação de parâmetros  
20 bioquímicos e de estresse oxidativo (Velisek et al., 2011).

21 Diversos estudos têm demonstrado vantagens na utilização dos extrativos vegetais  
22 (óleos essenciais, extratos aquosos, etanólicos e cerosos de plantas, etc...) como alternativos às  
23 substâncias químicas, uma vez que, em tese, são menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde  
24 do homem devido as suas propriedades bioativas e biodegradáveis (Inoue et al., 2005; Parodi  
25 et al., 2012; Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b). Além da sua eficácia na indução  
26 anestésica, a utilização de extratos vegetais tem como vantagem a diminuição do estresse e a  
27 potencial proteção contra danos oxidativos (Dias et al., 2012; Parodi et al., 2012; Barbas et al.,  
28 2016; Barbas et al., 2017b).

29 Deste modo, o estudo de produtos naturais, a exemplo dos extrativos vegetais,  
30 permitirá para além da investigação sobre os potenciais efeitos anestésicos, a avaliação do  
31 potencial antiestressante. Ainda, aliada à eficácia farmacológica, o produto natural candidato a  
32 anestésico e/ou antiestressante, poderá ser menos oneroso comparativamente às drogas  
33 sintéticas, sem que prescinda da segurança e eficácia necessárias, determinando ação rápida

sobre o sistema nervoso central e sem complicações posteriores para o animal (Cho e Heath, 2000; Gonçalves et al., 2008).

O capim citronela, *Cymbopogon nardus*, é uma planta originada do Sri Lanka e da Índia, utilizada em infusões como chá calmante e digestivo (Mahalwal e Ali, 2003; Castro et al., 2007). Apresenta propriedades antibacterianas e antioxidantes in vitro (Park et al., 2015). Em peixes, sua atividade anestésica foi comprovada por Barbas et al (2017a) ao anestésiar juvenis de tambaqui com óleo essencial (OE) de citronela. No entanto, não há informações na literatura referente a qual constituinte majoritário deste óleo seria o responsável pelos efeitos biológicos e comportamentais observados nos juvenis anestesiados ou, ainda, se tais efeitos são decorrentes de sinergia entre seus fitoconstituintes.

Entre os compostos químicos majoritários do *C. nardus*, estão os monoterpenos: citrionelol e geraniol, que são responsáveis pelo odor característico do OE (Castro et al., 2010). Além do uso desses compostos em vários produtos comerciais, incluindo cosméticos e fragrâncias, o geraniol exerceu ampla atividade farmacológica como anti-inflamatório, antioxidante, anti-ulcerativo, neuroprotetor, ação acaricida, atividade antisséptica inibindo o crescimento de fungos e bactérias (Martins, 2006; Solorzano-Santos e Miranda-Navales, 2012), além de potencial citoprotetor e antioxidante em modelos animais submetidos à estresse oxidativo (Tiwari e Kakkar, 2009). O citrionelol demonstrou atividade inibitória e bactericida (Lopez-Romero et al., 2015) além de efeito antifúngico, antiespasmódico, analgésico e anticonvulsivante (De Sousa et al., 2006; Quintans-Jfflnior, 2008).

Não existem informações na literatura, anteriormente a este trabalho, que tenham investigado o potencial desses dois isolados, citrionelol e geraniol, para peixes como anestésicos e antioxidantes. Ambos os isolados poderão funcionar como importantes alternativas, facilitando o manejo de peixes e atuando como importantes mitigadores de estresse.

## 2. EMBASAMENTO TEÓRICO

### 2.1 Anestésicos na Aquicultura

Os anestésicos têm sido utilizados na aquicultura a fim de garantir a supressão da dor e melhorar as condições de “bem-estar”, partindo-se da premissa que peixes são animais sencientes (Sneddon, 2003). Além disso, são utilizados para mitigar os efeitos deletérios decorrentes do estresse de manejos necessários. São utilizados na produção aquícola e para a imobilização dos animais com o objetivo de facilitar o manuseio durante os procedimentos de

despesca, biometria, reprodução artificial, desova e transporte. São importantes quando do manuseio de modelos experimentais animais, que são mantidos para fins de pesquisa e que requerem manejo constante, por muitas vezes exigindo procedimentos invasivos e um estado de inconsciência (Sylvester, 1975; Ackerman et al., 1990; Coyle et al., 2004; Lambooij et al., 2006; Weber et al., 2008; Zahl et al., 2012; Sneddon, 2003, 2012; Ghisi e Oliveira, 2016; Readman et al., 2017).

Neste sentido, para um anestésico ser considerado eficiente, além de ter baixo custo, ser atóxico, e de fácil administração, este deve induzir a anestesia rapidamente com o mínimo de hiperatividade ou estresse, com recuperação rápida em uma condição o mais livre possível de estresse (Ross e Ross, 2008). Por isso, a concentração ideal de um anestésico e o tempo de anestesia, são de extrema importância, uma vez que podem afetar diretamente o tempo de recuperação/retorno.

As concentrações efetivas de um anestésico são avaliada pelo tempo de indução e tempo de recuperação (Falahatkar e Poursaeid, 2017). Através da análise comportamental, um anestésico promove mudanças comportamentais visíveis, devendo a indução ocorrer antes de 3 minutos e a recuperação em até 5 minutos, sendo 10 minutos como o limite máximo ideal para o tempo na recuperação (Marking e Meyer, 1985; Park et al., 2008; Ross e Ross, 2008). De acordo com Park et al. (2008), os estágios de anestesia incluem a agitação, perda de equilíbrio e paralisia completa dos movimentos com batimento opercular mínimo ou ausente. No retorno, o primeiro estágio é o restabelecimento do equilíbrio seguido da natação normal quando o animal é considerado recuperado.

### 2.1.1 Anestesia e Sedação

Os anestésicos atuam diretamente no sistema nervoso central (SNC) dos peixes, considerando que diferentemente dos demais invertebrados, as vias de administração para esses animais são distintas, uma vez que geralmente são anestesiados por banhos de imersão onde o anestésico é absorvido pelas brânquias e assim entra na corrente sanguínea até o SNC, bloqueando algumas ações reflexas (Burka et al., 1997; Treves-Brown, 2000; Sladky et al., 2001; Woody et al., 2002; Ross e Ross, 2008; Zahl et al., 2009; Barbas et al., 2016). Neste sentido, a dosagem e a concentração utilizadas, bem como o tempo de exposição, são determinantes para determinar a sedação, anestesia ou óbito (Coyle et al., 2004).

De acordo com Zahl et al (2012), a sedação é caracterizada pela diminuição da sensibilidade, e já a anestesia geral ocorre quando o animal atinge um estado de inconsciência,

1    imobilização e alívio da dor. Quando ocorre a perda completa ou parcial dos sentidos devido à  
2    depressão generalizada do SNC, o manuseio do animal durante procedimentos mais invasivos  
3    é facilitado, por isso, de preferência, devem ser acompanhados de relaxamento muscular  
4    efetivo, uma vez que em anestesia profunda os animais estão disponíveis para procedimentos  
5    rápidos e seguros (Ross and Ross, 2008; Uehara et al., 2019).

6            De modo geral, as concentrações consideradas ideais são determinadas em função do  
7    tempo de indução e de recuperação e quando em baixas concentrações ou em situação de  
8    anestesia superficial, os anestésicos podem ser utilizados como sedativos. Nessas condições,  
9    ocorre perda parcial de equilíbrio e supressão da reação à estímulos externos (Cooke et al.,  
10    2004; Barbas et al., 2017).

### 12            2.1.2 Transporte

13            O transporte de peixes pode ser realizado em sistema aberto ou fechado (e.g., sacos  
14    plásticos), e é considerada prática rotineira das mais importantes no manejo e no processo de  
15    produção. Por ser considerado um momento crítico, exige cuidados, sendo um estressor  
16    importante na aquicultura e que impacta o sucesso da recria, por exemplo. A captura, as  
17    mudanças de temperatura, a duração, a densidade, além do próprio transporte são fatores  
18    potencialmente perturbadores da homeostase (Gomes et al, 2003; Carneiro et al., 2002; Barbas  
19    et al., 2017c).

20            No Brasil, o transporte mais utilizado é o sistema fechado, que é realizado em sacos  
21    plásticos de polietileno com um terço do volume útil preenchido com água e dois terços com  
22    injeção de oxigênio puro (Berka, 1986; Bendhack, 2004; Sampaio e Freire, 2016). Essas  
23    condições podem desencadear diversos tipos de estresse, tanto fisiológico que consiste nas  
24    alterações nos processos metabólicos, osmorregulatórios, inflamatórios e imunológicos dos  
25    organismos, quanto estresse comportamental, com tentativa de fuga, natação errática e  
26    acelerada, que são ocasionados por altos níveis de vibração, choques repentinos e ruídos  
27    elevados que ocorrem normalmente no momento do transporte (Ross e Ross, 2008). Tais fatores  
28    exigem a adoção de procedimentos eficazes e capazes de assegurar o bem-estar e sobrevivência  
29    dos animais durante todo o trajeto.

30            Uma alternativa adotada para mitigar o estresse fisiológico durante o transporte é o  
31    uso do cloreto de sódio (NaCl) dissolvido na água do transporte, proporcionando um equilíbrio  
32    osmótico entre o animal e o meio (Barton e Peter, 1982; Gomes et al., 2003; Oliveria et al.,

2009). Entretanto, não há efeito sedativo propriamente quando do uso de sal. Nesse sentido, o uso de anestésicos sintéticos e naturais tem sido bastante difundido (Gomes et al., 2003; Bendhack, 2004; Anjos et al., 2007; Oliveira et al., 2009). Quando em doses sedativas, o anestésico pode ser suficiente para diminuir o estresse no transporte de peixes considerando que este não é procedimento invasivo (Sneddon, 2012; Barbas et al., 2017c, 2019).

Quando em baixas concentrações, o uso do anestésico é capaz de diminuir a sensibilidade a estímulos visuais e mecânicos, onde o animal tem sua atividade reduzida, mantendo o equilíbrio parcial e a capacidade de natação, sendo uma condição considerada ideal para o transporte uma vez que reduz o metabolismo (consumo de oxigênio dissolvido), o estresse e também evita danos físicos (Cooke et al., 2004; Coyle et al., 2004; De Souza et al., 2019).

### 2.1.3 Uso de extrativos vegetais

Os anestésicos para peixes podem ser divididos em produtos sintéticos e naturais (à base de plantas) (Zahl et al., 2010; Aydin e Barbas, 2020). Dentre os anestésicos sintéticos usados extensamente na aquicultura estão a benzocaína, que se torna uma opção por ser de fácil obtenção e baixo custo, e o metanossulfonato de tricaína (MS-222) esse composto causa depressão no sistema nervoso central e hipóxia, paralisando os peixes (Gomes et al., 2001; Popovic et al., 2012; Sneddon 2012; Vera et al., 2013).

No entanto, o efeito desses anestésicos como redutores de estresse em peixes durante o manejo se mostrou contraditório, pois reações adversas aos próprios anestésicos têm sido observadas em peixes expostos à essas substâncias. Vários estudos reportaram efeitos indesejáveis durante banhos anestésicos em peixes, como alterações nos parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo, perda de muco, irritação de brânquias e olhos, e também alguns desconfortos para os manipuladores (Velisek e al., 2011; Fujimoto et al., 2017; Roubach e Gomes, 2001), tornando o uso de anestésicos naturais uma alternativa aos tradicionais.

Nos últimos anos diversas pesquisas com o uso de produtos naturais com baixa ou nenhuma toxicidade como os extrativos vegetais (óleos essenciais - OE), extratos aquosos, etanólicos e cerosos de plantas) têm sido usados como anestésicos e sedativos para peixes (Inoue et al., 2005; Morais et al., 2012; Parodi et al., 2012; Barbas et al., 2016; Santos et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b; De Souza et al., 2019). Embora os OE tenham sido usados com sucesso para anestesia em peixes e aparentemente com poucos riscos de intoxicação, alguns estudos alertaram que essas substâncias devam ser avaliadas também com bastante critério,

1 como no caso do eugenol. Embora essa substância, derivada de uma planta, seja a mais  
2 amplamente usada na anestesia de peixes (Cho e Heath, 2000; Cooke et al., 2004; Inoue et al.,  
3 2011; Simões et al., 2011; Oliveira et al., 2009), estudos demonstraram efeito adverso  
4 importante, com os peixes apresentando comportamento convulsivo e epileptiforme durante  
5 exposição ao eugenol (Barbas et al., 2021). Outros produtos derivados de plantas também tem  
6 sido explorados quanto a sua adequação para o manejo de peixes (Façanha e Gomes, 2005;  
7 Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b; Souza et al., 2019; Vilhenta et al., 2019; Barbas et  
8 al., 2019; De Araújo et al., 2021; Costa et al., 2022).

9       Em geral, os efeitos farmacológicos dos OE e seus mecanismos de atuação no SNC de  
10 peixes ainda são bastante desconhecidos, podendo ser resultado direto de um único composto  
11 principal, interações de substâncias ou com efeito sinérgico dos fitoconstituintes (Heldwein et  
12 al., 2014; Cunha et al., 2017). Mudanças no tipo e na proporção de substâncias ativas nos OE  
13 são responsáveis por diferenças significativas nos efeitos sedativos e anestésicos. Vale ressaltar  
14 que os OE contém várias substâncias e a composição e concentração dos componentes dos  
15 óleos essenciais podem variar devido a fatores ecológicos e as condições edafoclimáticas,  
16 refletindo diretamente nas propriedades funcionais, até mesmo em plantas de mesma espécie  
17 (Steffens, 2010).

18       Por muito tempo o uso de extratos vegetais ou seus isolados, como os OEs, têm sido  
19 usados na indústria farmacêutica devido as suas diversas atividades, antibacteriana, analgésica  
20 e antioxidante. Os OE são substâncias voláteis, lipofílicas que se caracterizam por um forte  
21 odor, já que são comumente encontradas em plantas aromáticas. São substâncias complexas e  
22 com vários componentes, principalmente por terpenos, entre eles, estão os do tipo mono, que  
23 são moléculas voláteis que desempenham múltiplos papéis na biologia da planta (Tholl et al.,  
24 2004). São substâncias amplamente utilizadas nas indústrias farmacêutica por apresentar  
25 diversas atividades biológicas (Bastos et al., 2009; Menezes et al., 2010a,b; Lima et al., 2013;  
26 Santos et al., 2016) e recentemente estão sendo prospectados como anestésicos para peixes (De  
27 Araújo et al., 2021). Dentre os compostos encontrados em OE de plantas, destacam-se o  
28 geraniol e o citrionelol, que são monoterpenos quimicamente relacionados e encontrados em  
29 diversos OE incluindo o de *Cymbopogon nardus*.

30       O geraniol é um álcool terpeno primário, acíclico, insaturado que apresenta odor e  
31 sabor floral por isso, é amplamente usado como fragrância e sabor na indústria alimentícia.  
32 Diversos estudos já mostraram os efeitos farmacológicos desse composto, como antifúgico,  
33 neuroprotetor, hepatoprotetor, além de efeito antiinflamatório e antioxidante, inibindo a resposta

1 inflamatória e do estresse oxidativo e promovendo o metabolismo de células inflamatórias e  
2 aumentando o conteúdo de GSH e estimulando as atividades de enzimas antioxidantes; e  
3 também como antiarítmico em modelos de mamíferos (Martins, 2006; Tiwari e Kakkar, 2009;  
4 Chen e Viljoen, 2010; Solorzano-Santos and Miranda-Novales, 2012). O citrônol é um álcool  
5 acíclico natural e já mostrou efeitos cardioprotetores além de alguns efeitos farmacológicos  
6 como antifúgico, antiespasmódico, hipotensivo, vasorelaxante e atividade anticonvulsivante  
7 descrita (Bastos et al., 2009; Brito et al., 2012 Santos et al., 2019; Menezes et al., 2010).

8 De modo geral, é notória a aceitação que os produtos naturais tem ganhado nos últimos  
9 anos, sendo promissores como alternativas para uso na aquicultura em substituição a algumas  
10 drogas sintéticas que comprovadamente apresentaram efeitos adversos.

## 11 2.2 Marcadores Biológicos

12 Por muitos anos, a avaliação da anestesia em peixes tem se baseado, equivocadamente,  
13 apenas na análise visual do comportamental como uma metodologia padrão, o que não  
14 comprova a anestesia geral, analgesia ou miorelaxamento. Atualmente, sabemos que o  
15 anestésico interfere em vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos animais, que têm sido  
16 cada vez mais avaliados além disso, também, o tipo e a proporção de substâncias ativas no óleo  
17 essencial são determinantes na eficácia do anestésico (Aydin e Barbas, 2020).

### 18 2.2.1 Indicadores Eletrofisiológicos

19 Existem vários mecanismo envolvidos na anestesia de peixes, entre eles, o bloqueio  
20 de canais iônicos e modulação de receptores inibitórios de ácido gama-aminobutírico dos tipo  
21 A (GABA<sub>A</sub>). De modo geral, vários fenômenos biológicos são acompanhados por  
22 manifestações elétricas celulares associadas à mecanismos seletivos de transporte de  
23 permeabilidade iônica ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Cl^-$ ) que participam da geração de potencial de  
24 membrana nas células (Neumcke et al., 1981; Yang e Uchida, 1996; Delatre, 2007).

25 Quando em repouso, a célula apresenta diferença de potencial elétrico de várias  
26 dezenas de milivolts através da membrana plasmática, com meio intracelular negativo em  
27 relação aos líquidos extracelulares (Delatre, 2007). Quando ocorre uma perturbação desse  
28 estado, é gerado um potencial de ação, que pode se propagar e transmitir o estímulo para células  
29 vizinhas que são igualmente excitáveis. Esse processo está associado ao fluxo de íons por meio  
30 da membrana e é capaz de alterar a concentração iônica nos meios intra e extracelular, ou seja,  
31 por ser eletricamente polarizada, a membrana se abre invertendo a sua polaridade  
32 momentaneamente e essa difusão de íons a favor de gradientes de concentração é a mais

1 importante causa de manifestação elétrica em sistemas biológicos (Delatre, 2007; Krueger-  
2 Beck et al., 2011).

3 Assim, a avaliação dos registros eletrofisiológicos é fundamental para a compreensão  
4 dos processos de propagação de potenciais de ação em órgãos especializados. A condução de  
5 potenciais de ação em tecidos especializados, nervosos ou musculares, por exemplo, dá origem  
6 à manifestações eletrofisiológicas mensuráveis (Riberiro, 2013). A compreensão desses  
7 processos em condições normais ou alteradas em modelos experimentais, permite corroborar a  
8 avaliação comportamental normalmente reportada na literatura como metodologia de avaliação  
9 de anestesia e sedação em peixes, aumentando a validade, objetividade e consistência dos  
10 resultados.

11 Os anestésicos podem diminuir significativamente a frequência respiratoria em peixes,  
12 que é um indicativo indireto do fluxo de água que passa através das brânquias. Também é capaz  
13 de alterar o perfil eletrocardiográfico e eletroencefalográfico, além de modular os parâmetros  
14 eletromiográficos (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; De Araújo et al., 2021; Vilhena  
15 et al., 2019; Barbas et al., 2020; Costa et al., 2022). No entanto, estudos sobre o monitoramento  
16 eletrofisiológicos de peixes sob anestesia ainda são relativamente escassos.

17 De acordo com o acima exposto, a avaliação de marcadores eletrofisiológicos,  
18 possibilitam um entendimento mais detalhado dos efeitos provocados por novos fármacos  
19 durante e após a exposição, viabilizando ou não seu uso como anestésicos gerais para  
20 procedimentos mais invasivos como cirurgias e até mesmo eutanásia. Já que facilita o  
21 monitoramento dos efeitos de depressão sobre o SNC, podendo assim caracterizar a eficácia de  
22 um produto como anestésico geral (Barbas et al., 2017b; De Souza et al., 2019; Vilhena et al.,  
23 2019; De Araújo et al., 2021; Costa et al., 2022).

#### 24 25 2.2.2 Bioquímico: Estresse Oxidativo

26 O estresse é capaz de causar distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, como  
27 um excesso na geração de radicais livres, por exemplo. Por isso, os parâmetros bioquímicos  
28 têm sido avaliados em peixes frente à xenobióticos, onde é possível se verificar os níveis  
29 ocorrentes de atividade antioxidante (Tew e Ronai 1999). Apesar de a anestesia, por vezes, ser  
30 capaz de atenuar distúrbios bioquímicos e fisiológicos em peixes causados pelas práticas de  
31 manejo, o próprio anestésico pode atuar como um estressor e levar a alterações nos parâmetros  
32 bioquímicos, promovendo uma condição de estresse oxidativo (Velisek e al., 2011).

Os organismos possuem a capacidade natural de se adaptar ao ambiente ao qual estão inseridos, no entanto, quando submetidos a uma situação de estresse, a quantidade de radicais livre é aumentada e o excesso na geração desses radicais tem como consequência o enfraquecimento do sistema imunológica, afetando a capacidade de manutenção da homeostase. A formação de radicais livres ocorre de forma natural, como resultado do metabolismo aeróbico para a geração de ATP. Radicais livres se caracterizam por serem moléculas altamente reativas, pois possuem número ímpar de elétrons em sua última camada (Mariano, 2006, Oba et al., 2009; Hermes-Lima, 2004; Hermes-Lima et al., 2015).

No sistema biológico, os radicais livres buscam se estabilizar e reagem com os elétrons de outras biomoléculas a sua volta, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos. Uma vez que essas biomoléculas perdem um elétron, sofrem modificação na sua forma e função. Esses radicais livres e moléculas que surgem, são denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) ou pró-oxidantes e ocorrem em diferentes tecidos, sendo comum para todos os seres aeróbicos (Belló et al., 2000; Hermes-Lima, 2004).

Para se proteger e neutralizar a formação de EROs, os organismos dispõem de mecanismos de defesa antioxidante, comumente divididas em enzimáticas e não-enzimáticas, que se caracterizam como um conjunto de substâncias que reduzem os riscos de lesões oxidativas por EROs (Comporti, 2010). Entre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas estão o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), carotenoides, flavonoides, ácido lipóico e o tripeptídeo glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais (Vasconcelos et al., 2007; Lobo et al., 2010; Kütter et al., 2014; Wu et al., 2015). A GSH é uma molécula composta pela combinação de três resíduos de aminoácidos (cisteína, glicina e glutamina), e atua contra a formação de radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula, agindo como primeira linha de defesa contra a geração excessiva de ERO e na detoxificação de xenobióticos. Está presente nos organismos nas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG) (Wang et al., 2018) e sua capacidade antioxidante se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo de sua cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (P-SH) ou em tióis de baixo peso molecular (NPSH), como a cisteína e a GSH (Reischl et al., 2007; Ventura-Lima et al., 2009; Wang et al., 2018).

No entanto, quando a ação dos antioxidantes não é suficiente e ocorre uma perturbação do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes nos tecidos, se estabelece uma situação de estresse oxidativo, capaz de provocar danos em várias estruturas moleculares com danos permanentes a tecidos e órgãos (Halliwell e Gutteridge, 1989, 2007; Storey 1996;

Halliwell e Gutteridge, 2007; Lushchak et al., 2005; Jones, 2006; Bisbal et al., 2010; Lushchak, 2011; Liang et al., 2016).

Como vários mecanismos estão envolvidos na ação antioxidante celular, muitos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos já são utilizados como biomarcadores durante exposição de peixes à novas substâncias candidatas à anestésico, a fim de aumentar a capacidade antioxidante durante a manipulação rotineiras dos animais (Saccol et al., 2017; Souza et al., 2019; Boaventura et al., 2021).

### 2.3 Modelo Experimental: Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um caracíforme da família Serrasalminidae com ampla distribuição em toda a bacia amazônica e bacia do Orinoco, nativo do rio Amazonas, Orinoco e seus afluentes. Possui elevada tolerância às variações na qualidade água, principalmente pH (intervalos entre 4 a 8) e oxigênio dissolvido. Neste último caso, esta espécie apresenta um mecanismo de ajustes contra hipóxia, conferindo ao animal a capacidade de realizar a respiração na superfície aquática quando a concentração de oxigênio diminui para o nível de 0,5 mg L<sup>-1</sup> (Saint-Paul, 1984 a,b) através de uma adaptação morfo-anatômica que consiste na expansão dermal na mandíbula inferior, que tem a função de direcionar o fluxo da água superficial mais oxigenada para a região das brânquias (Braum & Junk, 1982; Saint-Paul, 1984a,b; Val, 1986). O tambaqui possui uma grande área de superfície branquial, que permite à espécie uma maior capacidade de absorção do oxigênio em situações de elevada demanda energética (Saint-Paul, 1984a,b). Sua resistência às condições de cultivo e às doenças, com elevadas taxas de crescimento foram essenciais para a melhoria de suas condições de criação (Saint-Paul, 1986; Valladão et al., 2016).

Há muito a se desvendar a respeito das respostas fisiológicas dos peixes expostos às diferentes substâncias anestésicas e antiestressantes, sendo que o tambaqui tem sido reforçado como um modelo experimental *in vivo* promissor, considerando a sua resistência ao manuseio e a sua alta sensibilidade aos testes de novos produtos anestésicos para uso na aquicultura (Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a,b; De Souza et al., 2019; Aydin e Barbas, 2020).

## 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia anestésica dos fitoconstituintes geraniol e citronelol em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, através da verificação dos tempos de indução e

recuperação, através de ensaios de concentração-resposta, e seus efeitos sobre o comportamento, parâmetros de eletrofisiologia e balanço oxidativo.

### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar as latências para anestesia rápida e profunda e a recuperação em juvenis de *C. macropomum* submetidos a banhos anestésicos com geraniol e citrônolol;
- Caracterizar a extensão do miorelaxamento através da análise do eletromiograma, além de avaliar os impactos sobre a função cardiorrespiratória por meio 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 geraniol e citrônolol;
- Caracterizar a extensão da depressão do SNC através das respostas e alterações no traçado eletroencefalográfico em juvenis de *C. macropomum* expostos a banhos de curta duração com o geraniol e citrônolol;
- Avaliar o balanço oxidativo e o potencial quimioprotetivo dos compostos através da verificação da capacidade antioxidante total (ACAP), níveis de GSH e P-SH, e do indicador de peroxidação lipídica (TBARS) em amostras de brânquias, cérebro, fígado e músculo de juvenis de *C. macropomum* submetidos a simulação de transporte por diferentes tempos em água adicionada de concentrações sedativas de geraniol e citrônolol.

## 4. REFERÊNCIAS

- Ackerman, P. A.; Morgan, J. D.; Iwama, G. K. Physiology of Anesthesia. Exposure.1–22, 1990.
- Araujo-Lima, C., Goulding, M., 1998. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Brasília: MCT-CNPq, 186p.
- Baldisserotto, B. (2013). Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, RS. 3º 1120 ed. UFSM Ed. 352 p.
- Barbas, L.A.L., Stringhetta, G.R., Garcia, L.O., Figueiredo, M.R.C., Sampaio, L.A., 2016. 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, M., De Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., De Lima, H.D.S.T., Torres, M.F., Do Nascimento, L.A.S., Da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017a. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. Aquaculture. 479, 60 – 68.
- Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., de Garcia, L.O., Monserrat, J.M., da Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2017b. Properties of two plant extractives as

1 anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Aquaculture  
2 469, 79–87.

3 Barbas, L.A.L., Pereira-Cardona, P.M., Maltez, L.C., Garcia, L.O., Monserrat, J.M., Sampaio,  
4 L.A., 2017c. Anaesthesia and transport of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier,  
5 1818) with tricaine methane-sulphonate: Implications on secondary and oxidative stress  
6 responses. J. Appl. Ichthyol. 00, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jai.13382>

7 Barbas, L.A.L., De Araújo, E.R., Torres, M.F., Maltez, L.C., Garcia, L.O., Heinzmann, B.M.,  
8 Sampaio, L.A., 2019. Stress relieving potential of two plant-based sedatives in the transport of  
9 juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*, Aquaculture, doi:  
10 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734681>

11 Barbas, L.A.L., Torres, M.F., da Costa, B.M.P.A., Feitosa, M.J.M., Maltez, L.C., Amado, L.L.,  
12 Toda, Y.P.S., Batista, P.S., Cabral, D.A.C., Hamoy, M., 2021. Eugenol induces body  
13 immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths.  
14 Aquat. Toxicol. 231, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105734>.

15 Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J.,  
16 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição.  
17 23, 629-643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

18 Barton, B.A., Peter, R.E., 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout,  
19 *Salmo gairdneri* (Richardson), to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock.  
20 Journal of Fish Biology. 20, 39-51

21 Bastos, J.F., Moreira, I.J., Ribeiro, T.P., Medeiros, I.A., Antonioli, A.R., De Sousa, D.P.,  
22 Santos, M.R., 2009. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene  
23 alcohol, in rats. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 106, 331–337. DOI [10.1111/j.1742-](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x)  
24 [7843.2009.00492.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x)

25 Belló, A.R.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B. & Bianchini,  
26 A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater  
27 fish *Rhamdia quelen*. Diseases of Aquatic Organisms 42, 233-236.

28 Bendhack, F., 2004. Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de  
29 matrinxãs (*Brycon cephalus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
30 Paulista/CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo.

31 Berka, R., 1986. The transport of live fish. A review. EIFAC tech. Pap. 48, 52p.

32 Bisbal, C., Lamberta, k., Avignona, A., 2010. Antioxidants and glucose metabolism disorders.  
33 Current Opinion in Clinical nutrition and Metabolic Care. 13, 439-446.

34 Boaventura, T.P., Souza, C.F., Ferreira, A.L., Favero, G.C., Baldissera, M.D., Heinzmann,  
35 B.M., Baldisserotto, B., Luz, R.K., 2021. The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil  
36 during the transport of *Lophiosilurus alexandri*: Water quality, hematology, blood biochemistry  
37 and oxidative stress. Aquaculture, 531, e735964.  
38 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735964>.

39 Braum, E., Junk, W.J., 1982. Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces)  
40 for surviving in oxygen deficient waters. Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 67: 869-886.

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

1 Cantanhêde, S.M., Hamoy, M., Montag, L.F.A., Amado, L.L., 2020. Electrophysiological  
2 responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes:  
3 Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol.*  
4 *Pharmacol.* 228, 108653. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>.

5 Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., Martins, M.L., 2002. Transport with different benzocaine  
6 concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population  
7 of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Science* 24:  
8 555-560.

9 Castro, H.G., Barbosa, L.C.A., Leal, T.C.A.B., Souza, C.M., Nazareno, A.C., 2007.  
10 Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Revista*  
11 *Brasileira de Plantas Medicinais*, v.9, p.55–61.

12 Castro, H.G., Perini, V.B.M., Santos, G.R., Leal, T.C.A.B., 2010. Evaluation of content and  
13 composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. *Rev.*  
14 *Ciênc. Agron.* 41: 308–314.

15 Chen, W., Viljoen, A.M., 2010. Geraniol-A review of a commercially important fragrance  
16 material. *South African Journal of Botany.* 76, 643-651.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>.

18 Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove  
19 oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*  
20 (Walbaum). *Aquac. Res.* 31, 537–546. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00478.x>.

21 Comporti, M., 2010. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *Journal of the Siena*  
22 *Academy of Sciences.* 2, 13–26.

23 Cooke, S.J., Suski, C.D., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Wahl, D.H., 2004. Behavioral and  
24 physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and  
25 transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* 239: 509-529.

26 Costa, B.M.A., Torres, M.F., Silva, R.A., Aydın, B., Amado, L.L., Hamoy, M., Barbas, L.A.L.,  
27 2022. Integrated behavioural, neurological, muscular and cardiorespiratory response in  
28 tambaqui, *Colossoma macropomum* anaesthetized with menthol. *Aquaculture.* 560, 738553.  
29 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738553>

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

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

34 Cunha, J.A., Scheeren, C.A., Scheeren, J., Gressler, L.T., Madaloz, L.M., Bandeira Junior, G.,  
35 Biachini, A.E., Pinheiro, C.G., Bordignon, S.A.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2017.  
36 Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*:  
37 Efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Sociedade Brasileira de Ictiologia.* 15,  
38 883-887. DOI:10.1590/1982-0224-20160076.

39 De Araújo, E.R.L., Silva, J.S., Lopes, L.M., Torres, M.F., Alho da Costa, B.M.P., Amarante,  
40 C.B., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., Sampaio, L.A., 2021. Geraniol and citronellol as alternative  
41 and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture*  
42 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>.

43 De Sousa, D.P., Gonçalves, J.C.R., Quintans-Júnior, L., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., Almeida,  
44 R.N., 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents.  
45 *Neurosci Lett* 401, 231–5.

1 De Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., De Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L.,  
2 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked  
3 myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory  
4 responses. *Aquaculture* 500, 160–169.

5 Delattre, E., 2007. Fundamentos de eletrofisiologia: potenciais de membrana. 40, 378-393.

6 Dias, A.M.A., Santos, P., Seabra, I.J., Júnior R.N.C., Braga, M.E.M., de Sousa H.C., 2012.  
7 Spilanthol from *Spilanthus acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical  
8 carbon dioxide extraction. *J. Supercrit. Fluids* 61, 62–70.

9 Façanha, M.F., Gomes, L.C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui  
10 (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amaz.* 35, 71–75.

11 Falahatkar, B., Poursaeid, S., 2017. Anaesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate for  
12 Persian sturgeon larvae. *Aquaculture Research*, 48, 4578–4581.  
13 <https://doi.org/10.1111/are.13084>.

14 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2022. The State of World  
15 Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome.

16 Fujimoto, R.Y., Pereira, D.M., Silva, J.C., Oliveira, L.C.A.O., Inoue, L.A.K.A., Hamoy, M.,  
17 Mello, V.J., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2017. Clove oil induces anaesthesia and blunts  
18 muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish Physiol Biochem*, 44, 245–256.

19 Ghisi, N.C.; Oliveira, E. C., 2016. Bem-estar em peixes: O status da ciência por meio de análise  
20 cienciométrica. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 253–261.

21 Gomes, L.C., Chippari-Gomnes A.R., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R.M.,  
22 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J.*  
23 *World Aquac. Soc.* Baton Rouge 32, 426–431. DOI [https://doi.org/10.1111/j.1749-](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x)  
24 [7345.2001.tb00470.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x).

25 Gomes, L.C.; Araújo-Lima, C.A.R.M.; Roubach, R., Chippari-Gomes, A.R.; Lopes, N.P. 2003.  
26 Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui  
27 *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 76–84.

28 Gomes, L. C., Simões, L. N., & Araújo-Lima, C. A. R. M. (2010). Tambaqui (*Colossoma*  
29 *macropomum*). In: Baldissierotto, B., & Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura*  
30 *no Brasil* (2 ed.) (pp. 175 – 204). Santa Maria: Ed. UFSM.

31 Gonçalves, A.F.N., Santos, E.C.C., Fernandes, J.B.K., Takahashi, L.S., 2008. Menthol and  
32 eugenol as benzocaine substitutes in anesthetic induction of pacu juveniles. *Acta Sci. Anim.*  
33 *Sci.* 30, 339–344. DOI 10.4025/actascianimsci.v30i3.1081

34 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. 2 ed. Oxford:  
35 Claredon, 469p.

36 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free radicals in biology and medicine (4th 877 ed.).  
37 New York, NY: Oxford University Press.

38 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford. 5th ed.:  
39 Oxford University Press. EUA. 944.

40 Heldwein, C.G., Silva, L.L., Gai, E.Z., Roman, C., Parodi, T.V., M.E., Burger, Baldissierotto,  
41 B., Flores, E.M.M., Heinzmann, B.M., 2014. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and  
42 anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*.  
43 doi:10.1111/vaa.12146.

1 Heo, G.J., Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius*  
2 *carassius*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 37, 132–135. Doi:10.1111/j.1467-  
3 2995.2009.00510.x

4 Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals, in: Storey,  
5 K.B. (Ed.), *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, pp. 319-  
6 368.

7 Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos,  
8 T. C., Campos, É.G. 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic  
9 depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89,  
10 1122-1143.

11 IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA: pesquisa da pecuária municipal,  
12 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2020>

13 Inoue, L.A.K.A., Neto, C. do S., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of  
14 matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural* 33, 943–947.  
15 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>.

16 Inoue, L.A.K.A., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., Moraes, G., 2005. Effects of clove oil on the  
17 stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amaz.* 35, 289–295.  
18 DOI <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>.

19 Inoue L.A.K.A., Boijink C.L., Ribeiro P.T., Silva A.M.D., Affonso E.G., 2011. Avaliação de  
20 respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amaz.* 41,  
21 327-32.

22 Jones, D.P. 2006. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging.  
23 *Rejuvenation Research*, 9(2), 169-181.

24 Kütter, M. T., Romano, L. A., Ventura-Lima, J., Tesser, M. B., & Monserrat, J. M., 2014.  
25 Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms.  
26 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, 70-76.  
27 Doi: 10.1016/j.cbpc.2014.03.008.

28 Krueger-Beck, E., Scheeren, E.M., Nogueira-Neto, G.N., Button, V.L.S.N., Neves, E.B.,  
29 Nohama, P., 2011. *Fisioterapia em Movimento*, vol. 24, n. 3. [https://doi.org/10.1590/S0103-](https://doi.org/10.1590/S0103-51502011000300018)  
30 [51502011000300018](https://doi.org/10.1590/S0103-51502011000300018)

31 Lambooi, E., Kloosterboer, R. J., Gerritzen, M. A., Van De Vis, J. W., 2006. Assessment of  
32 electrical stunning in fresh water of African Catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice  
33 water for loss of consciousness and sensibility. *Aquaculture*, 254, 388–395.

34 Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., Song, L., 2016. Ammonia exposure  
35 induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of  
36 pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 523-528.  
37 10.1016/j.fsi.2016.05.009

38 Lima, M. da S., Quintans-Júnior, L.J., de Santana, W.A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares,  
39 M.B., Villarreal, C.F., 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of  
40 interleukin-10. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 112–117. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.040

41 Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional  
42 foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4, 118–126.

43 Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A., Simões, M., 2015. Antibacterial effects  
44 and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia*

1 *coli* and *Staphylococcus aureus*. Evid.-Based Compl. Alt. 2015, 1-9. DOI  
2 <https://doi.org/10.1155/2015/795435>.

3 Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, V., & Storey, K.  
4 B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant  
5 enzymes in goldfish tissues. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37,  
6 1670-1680. Doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.024

7 Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic  
8 Toxicology, 101(1), 13-30.

9 Mahalwal V.S, Ali M., 2003. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle.  
10 Flavour Fragr. J. 18, 73–76. DOI <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1144>.

11 Maltez, L., Rodrigues, G., Enamorado, A., Okamoto, M., Romano, L., Monserrat, J., Sampaio,  
12 L., Garcia, L., 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress  
13 responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Fish Physiology  
14 Biochemical. 43, 1747 –1759.

15 Mariano, W.S., 2006. Respostas Fisiológicas e Bioquímicas do jeju *Hoplerthrinus*  
16 *unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea. 72p. Dissertação (Mestrado).  
17 Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

18 Marking, L.L., Meyer, F.P., 1985. Are better anesthetics needed in fisheries? Fisheries, [s. l.],  
19 v. 10, n. 6, p. 2–5.

20 Martins R.M., 2006. Estudio “in vitro” de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea  
21 citronela de java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. Rev.  
22 Bras. Plantas Med. 08, 71–78.

23 Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering, A.D.  
24 Stress and Fish. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 49-75.

25 Menezes, I.A.C., Moreira, I.J.A., de Paula, J.W.A., Blank, A.F., Antoniolli, A.R.,  
26 QuintansJúnior, L.J., Santos, M.R.V., 2010a. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon*  
27 *winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. J. Pharm.  
28 Pharmacol. 62, 215–21. doi:10.1211/jpp.62.02.0009

29 Menezes, I.A.C., Barreto, C.M.N., Antoniolli, Â.R., Santos, M.R. V, de Sousa, D.P., 2010b.  
30 Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J.  
31 Biosci. 65 C, 562–566. doi:10.1515/znc-2010-9-1005.

32 Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology,  
33 antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere. 81, 781–787.  
34 Doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.005.

35 Morais, S.R., Oliveira, T.L.S., Bara, M.T.F., Conceição, E. C., Rezende, M.H., Ferri, P. H.;  
36 Paula, J. R. De., 2012. Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham.  
37 (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. International journal of  
38 analytical chemistry, [s. l.], v. 2012, p. 363919.

39 Mudado, M.A., Moreira, T.H., Cruz, J.S., 2003. O início da era dos canais iônicos. Clínica Hoje  
40 33, 56–58.

41 Neumcke, B., Schwarz, W., Stämpfli, R., 1981. Block of Na channels in the membrane of  
42 myelinated nerve by benzocaine. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 390, 230–236.

- 1 Oba, E.T., Mariano, W.S., Santos, L.R.B., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e  
2 atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias, M. (Org.) Manejo e Sanidade de Peixes  
3 em Cultivo. Embrapa Amapá, Macapá, AP. 226-247.
- 4 Oliveira, J.R., Carmo, J.L., Oliveira, K.K.C., Soares, M.C.F., 2009. Cloreto de sódio,  
5 benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. Revista Brasileira  
6 de Zootecnia, 38, 1163-1169.
- 7 Park, M.O., Hur, W.J., Im, S.Y., Seol, D.W., Lee J., Park, I.S., 2008. Anaesthetic efficacy and  
8 physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. Aquac.  
9 Res. 39, 877–884. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>.
- 10 Park, J-Y., Kim, J-Y., Jang, S-H., Kim, H-J., Lee S-J, Park, S-C., 2015. Biological activities  
11 and acute oral toxicity of citronella and lemongrass oil. Korean J. Vet. Res. 55, 13–20. DOI  
12 <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.1.13>.
- 13 Pawar, H.B., Sanaye, S.V., Sreepada, R.A., Harish, V., Suryavanshi, U., Tanu, Ansari, Z., 2011.  
14 Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda*  
15 (Bleeker, 1852). Aquaculture, [s. l.], v. 311, n. 1– 4, p. 155–161.  
16 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.007>.
- 17 Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., De Souza, D.M., Martins, Á.C., Garcia L.O.,  
18 Wasielesky, W.Jr., Monserrat J.M., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B., Baldisserotto,  
19 B., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia*  
20 *triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). Comp.  
21 Biochem. Phys. C 155, 462–8. DOI [10.1016/j.cbpc.2011.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003).
- 22 Popovic, N.T., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Berakovic, A.P.,  
23 Klobucar, R.S., 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia.  
24 Journal of Applied Ichthyology, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 553–564.
- 25 Quintans-Júnior, L.J., Souza, T.T., Leite, B.S., Lessa, N.M.N., Bonjardim, L.R., Santos,  
26 M.R.V., Blank, A.F., Antonioli, A.R., 2008. Phytochemical screening and anticonvulsant  
27 activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents.  
28 Phytomedicine 15, 619–24. DOI [10.1016/j.phymed.2007.09.018](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.018).
- 29 Readman, G.D., Owen, S.F., Knowles, T.G., Murrell, J.C., 2017. Species specific anaesthetics  
30 for fish anaesthesia and euthanasia. Scientific Reports, [s.l.], n. June, p. 1-7.  
31 <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06917-2>
- 32 Reischl, E., Dafre, A.L., Franco, J.L., Wilhelm Filho, D., 2007. Distribution, adaptation and  
33 physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. Comp Biochem Physiol C  
34 Toxicol Pharmacol. 146, 22-53. Doi: [10.1016/j.cbpc.2006.07.015](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.07.015).
- 35 Ribeiro, L.C., 2013. Investigação do efeito ictiotóxico do extrato etanólico da raiz de *spilanthes*  
36 *acmella* (jambú) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental.  
37 (Dissertação Mestrado)Universidade Federal do Pará, [s. l.]
- 38 Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals.  
39 Blackwell Publishing, Oxford, UK. (228 p).
- 40 Roubach, R., Gomes, L.D.C., 2001. O Uso de Anestésicos Durante o Manejo de Peixes. PhD  
41 Proposal, [s. l.], v. 1, p. 37–40.
- 42 Saccol, E.M., Toni, C., Pês, T.S., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Silva, L.V., Mourão, R.H.V.,  
43 Oliveira, R.B., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2017. Anaesthetic and antioxidant effects of  
44 *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma*  
45 *macropomum*). Aquaculture Research, 48, 2012-2031. <https://doi.org/10.1111/are.13034>.

1 Saint-Paul, U. 1984a. Ecological and physiological investigations of *Colossoma macropomum*,  
2 a new species for fish culture in Amazonia. Mems. Soc. Latinoam. Acuicult. 5: 501-518.

3 Saint-Paul, U. 1984b. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish  
4 *Colossoma macropomun*, Serrasalminidae. Env. Biol. Fish. 11: 53-62.

5 Saint-Paul, U., 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review.  
6 Aquaculture 54, 205–240. DOI [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90329-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90329-7).

7 Sampaio, F.D., Freire, C.A., 2016. An overview of stress physiology of fish transport: changes  
8 in water quality as a function of transport duration. Fish and Fisheries, 17, 1055-1072.  
9 <https://doi.org/10.1111/faf.12158>.

10 Santos, P.L., Brito, R.G., Oliveira, M.A., Quintans, J.S.S., Guimarães, A.G., Santos, M.R. V,  
11 Menezes, P.P., Serafini, M.R., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Araújo, A.A.S., Quintans-  
12 Júnior, L.J., 2016. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ cyclodextrin complexed  
13 with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-  
14 hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. Phytomedicine 23, 948–57.  
15 doi:10.1016/j.phymed.2016.06.007

16 Santos, P. L., Matos, J. P. S.C.F., Picot, L., Almeida, J. R.G.S., Quintans, J. S. S., Quintans-  
17 Júnior, L. J. 2019. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological  
18 activities - A systematic review. Food and Chemical Toxicology. 123, 459-469.  
19 Doi:10.1016/j.fct.2018.11.030

20 Sladky, K.K. Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001.  
21 Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red  
22 pacu (*Piaractus brachypomus*). Am. J. Vet. Res. 62, 337–342. DOI  
23 <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>.

24 Simões, L.N., Lombardi, D.C., Gomide, A.T.M., Gomes, L.C., 2011. Efficacy of clove oil as  
25 anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii:  
26 Cichlidae) juveniles. Zoologia. 28,285–290. Doi: 10.1590/S1984-46702011000300001

27 Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as  
28 antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 136–141. DOI [10.1016/j.copbio.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005).

29 Souza, C.F., Baldissera, M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Martos-Sitcha, J.A., Mancera,  
30 J.M., 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A Review. Frontiers in  
31 Physiology, 10, 785. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>.

32 Sneddon, L.U., 2003. The evidence for pain in fish: The use of morphine as an analgesic.  
33 Applied Animal Behaviour Science. 83, 153:162.

34 Sneddon, L.U., 2012. Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. Journal of Exotic Pet Medicine  
35 21, 32-43.

36 Steffens, A.H., 2010. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação  
37 por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. Porto Alegre. Dissertação. Programa de  
38 Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do  
39 Rio Grande Do Sul.

40 Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29,  
41 1715–1733.

42 Svoboda, M., Kolarova, J., 1999. A survey of anaesthetics used in the fish farming. Health  
43 Protection of Fish - Proceeding of Papers. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiolo y  
44 odňany pp 49-72.

1 Sylvester, J.R., 1975. Factors influencing the efficacy of MS-222 to striped mullet (*Mugil*  
2 *cephalus*) Aquaculture 6, 163–169. DOI [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(75\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(75)90067-8).

3 Tew, K.D., Ronai, Z., 1999. GST function in drug and stress response. Drug Resistance Updates  
4 2, 143-147.

5 Tholl, D., Kish, C.M., Orlova, I., Sherman, D., Gershenzon, J., Pichersky, E., Dudareva, N.,  
6 2004. Formation of Monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* Flowers Involves  
7 Heterodimeric Geranyl Diphosphate Synthases. The Plant Cell. 16, 977–992.  
8 <https://doi.org/10.1105/tpc.020156>.

9 Tiwari, M., Kakkar, P., 2009. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat  
10 alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. Toxicol. in Vitro 23, 295–301.  
11 DOI [10.1016/j.tiv.2008.12.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.014).

12 Treves-Brown, K.M., 2000. Anaesthesia. Em: Treves-Brown, K.M. (Ed.), Anaesthetics in  
13 Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 206–217.

14 Uehara, S.A., Andrade, D.R., Takata, R., Gomes Junior, A.V., Vidal, M.V., 2019. The  
15 effectiveness of tricaine, benzocaine, clove oil, and menthol as anaesthetics for lambari-bocarra  
16 *Oligosarcus argenteus*. Aquaculture. 502, 326–331.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.054>

18 Val, A.L. (1986) Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Charcoidei,  
19 Pisces): Aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM). Tese de Doutorado.  
20 INPA/FUA, Manaus. 112p

21 Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental  
22 aquaculture. Rev. in Aquacult., 10, 351–369. DOI <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.

23 Vasconcelos, S.M., Goulart, M.O., Moura, J.B., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T.,  
24 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano  
25 oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. Química.  
26 Nova, 30, 1323–1338. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>

27 Velisek, J., Stara, A., Li, Z-H., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four  
28 anaesthetics on biochemical blood profiles. Aquaculture. 310, 369-375.  
29 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>.

30 Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L.M.,  
31 Bohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Marins, L.F.F., da Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo,  
32 M.R., Monserrat, J.M. 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills  
33 of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C:  
34 Toxicology & Pharmacology, 149(4), 538- 543.

35 Vera, L.M, Montoya, A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2013. Effectiveness of the anaesthetic MS-  
36 222 in gilthead seabream, *Sparus aurata*: Effect of feeding time and day–night variations in  
37 plasma MS-222 concentration and GST activity. Physiology & Behavior 110-111, 51-57.

38 Vidal, L.V.O., Albinati, R.C.B., Albinati, A.C.L., Lira, A.D., Almeida, T. R., Santos, G.B.,  
39 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, [s. l.],  
40 v. 43, n. 8, p. 1069–1074.

41 Vilhena, C.S., Nascimento, L.A.S., Andrade, E.H.A., Silva, J.K.R., Hamoy, M., Torres, M.F.,  
42 Barbas, L.A.L., 2019. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like  
43 state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*.  
44 Aquaculture, 510, 169-175.

- 1 Wang, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Gao, W., Zhang, W., Mai, K. 2018. Reduced  
2 glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative capacity,  
3 disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish*  
4 *Immunology*, 73, 152-157
- 5 Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Hansen, M.K., 2009.  
6 Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and  
7 importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture* 295, 52–59. DOI  
8 [10.1016/j.aquaculture.2009.06.019](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.019).
- 9 Weber, R. A.; Peleteiro, J. B.; Martín, L. O. G.; Aldegunde, M., 2008. The efficacy of 2-  
10 phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese  
11 sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, [s. l.], v. 288, p. 147–150.
- 12 Wu, S.M., Liu, J.H., Shu, L.H., Chen, C.H. 2015. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio*  
13 *rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. *Comparative Biochemistry and*  
14 *Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 187, 202-213.
- 15 Woody, C.A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye  
16 salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, [s. l.], v. 1, p. 1–8.
- 17 Yang, J., Uchida, I., 1996. Mechanisms of etomidate potentiation of GABA<sub>A</sub> receptor-gated  
18 currents in cultured postnatal hippocampal neurons. *Neuroscience*. 73, 69–78.
- 19 Zahl, I.H., A. Kiessling, O.B. Samuelsen, Olsen, R.E., 2010. Anesthesia induces stress in  
20 Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (i). *Fish*  
21 *Physiol. Biochem.*, 36: 719-730.
- 22 Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: Implications for  
23 welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 201–218. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1>.

## CAPÍTULO 1

### **Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish**

Ednara Ronise L. de Araújo<sup>a</sup>, Jhusicleide da Silva e Silva<sup>b</sup>, Larissa Matias Lopes<sup>b</sup>, Marcelo Ferreira Torres<sup>b</sup>, Brenda M. P. Alho da Costa<sup>b</sup>, Cristine Bastos do Amarante<sup>c</sup>, Moisés Hamoy<sup>d,1</sup>, Luis André L. Barbas<sup>b,2</sup>, Luís André Sampaio<sup>a,3</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Rio Grande – RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal – PA, Brazil

<sup>c</sup>Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – PA, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brazil

Corresponding authors at:

\* Correspondence to: M. Hamoy, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará, UFPA Campus Belém, Rua Augusto Corrêa nº 01 Guamá, CEP 66075–110 Belém, PA, Brazil.

\*\* Correspondence to: L. A. L. Barbas, Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, IFPA Campus Castanhal, BR 316, Km 63 S/N, CEP 68740–970 Castanhal, PA, Brazil.

\*\*\* Correspondence to: L. A. Sampaio, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Instituto de Oceanografia, CP 474, CEP 96201–900 Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail addresses: hamoyufpa@gmail.com (M. Hamoy), andre.barbas@hotmail.com (L.A.L. Barbas), sampaio@mikrus.com.br (L.A. Sampaio).

Manuscrito publicado na revista *Aquaculture*

**Fator de imacto: 5.135**

**<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>**

**Received 29 October 2020; Received in revised form 11 February 2021; Accepted 12 February 2021**

**Available online 16 February 2021**

## Abstract

The efficacy of a product as an anaesthetic can be determined through combining behavioural assessment and the evaluation of selected electrophysiological markers, such as the electromyogram (EMG) and electrocardiogram (ECG) for muscle contraction power and cardiac function characterizations, respectively. This study aimed to evaluate the anaesthetic efficacy of geraniol (GRL) and citronellol (CTL) in tambaqui juveniles, *Colossoma macropomum*, through concentration-response trials, and their effects on behaviour and cardiorespiratory responses. Fish ( $24.78 \pm 2.50$  g) were assayed into two experimental groups: I – Behavioural Assessment: In which six concentrations were tested (10; 30; 50; 70; 90; and  $110 \mu\text{L L}^{-1}$ ) for each compound. For both isolates the concentration of  $10 \mu\text{L L}^{-1}$  did not induce any signs of anaesthesia. As for the other concentrations, all fish were anaesthetized and fully recovered according to behaviour evaluation. Concentrations of  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  GRL and  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  CTL were considered the most effective doses as they promoted anaesthesia and allowed for recovery within appropriate time intervals; II – Electrophysiological Characterization: Concentrations of  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  GRL and  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  CTL were used for the recordings of EMG, ECG, opercular beat intensity and rate (OBI and OBR), and heart rate (HR). For both experiments, nine fish per concentration ( $n = 9$ ) per analysis were used and each animal was considered a replicate. Our results demonstrated that geraniol and citronelol induced full body immobilization, which resulted at least in part, from the myorelaxant properties of these compounds. GRL and CTL at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  and  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectively were sufficient to render fish fully and rapidly immobilized. Both products transiently reduced ventilation during anaesthesia, nevertheless allowing for complete recovery after exposure. Although either isolate significantly decreased heart rates, they did not compromise resumption of normal cardiac function. In general, no mortalities were observed and all animals recovered after exposure. Both products could be considered safe alternatives for fish handling and other aquaculture-related activities that might require fish immobilization.

## 1. INTRODUCTION

Intensive aquaculture demands close monitoring and frequent handling of aquatic organisms for biometrics, transport, spawning, and other potentially stressful procedures (Façanha and Gomes, 2005; Ross and Ross, 2008). The use of stress-relieving agents such as anaesthetics has increased in fish farming to mitigate stress, ensure increased yields, better

1 health conditions and survival rates, and also for welfare purposes (Sneddon, 2012; Barbas et  
2 al., 2017a, 2017b; Aydın and Barbas, 2020).

3 A general anaesthetic should act promptly on the central nervous system (CNS)  
4 without further complications to the fish. Moreover, anaesthetics are expected to reversibly  
5 promote CNS depression with loss of sensation and response to environmental stimuli  
6 (Sylvester, 1975; Ross and Ross, 2008). The choice of an anaesthetic is usually associated with  
7 economic feasibility and depends on legal constraints.

8 Several synthetic substances have been used to induce anaesthesia and facilitate stress  
9 prevention, including products such as benzocaine and methanesulfonate of tricaine (MS-222),  
10 which are commonly used drugs (Gomes et al., 2001; Cotter and Rodnick, 2006; Sneddon,  
11 2012). However, some studies have warned about undesirable effects such as bleeding,  
12 hyperglycaemia, loss of mucus, olfactory problems, intense irritability, damage to the corneas,  
13 stress and death (Losey and Hugie, 1994; Ross et al., 2007; Sneddon, 2012; Aydın and Barbas,  
14 2020).

15 On the other side, several studies have shown advantages with the use of natural  
16 products, e.g., herbal extractives (essential oils, aqueous extracts, ethanolic and waxy plant  
17 extracts, etc....) which were of similar or superior efficacy, showing less toxicity to fish  
18 compared to commonly used synthetic anaesthetics (Inoue et al., 2005; Parodi et al., 2012;  
19 Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a, 2017b). Natural anaesthetics or plant-derived stress  
20 relieving products could be less expensive compared to synthetic drugs, without compromising  
21 safety and efficacy (Cho and Heath, 2000; Gonçalves et al., 2008).

22 Citronella grass, *Cymbopogon nardus*, is a plant originated from Sri Lanka and India  
23 (Mahalwal and Mahalwal and Ali, 2003) that has shown antibacterial and antioxidant properties  
24 in vitro being widely used in teas for its soothing properties (Castro et al., 2010; Park et al.,  
25 2015). Its anaesthetic activity has been suggested by Barbas et al. (2017a) when exposing  
26 juveniles of tambaqui, *Colossoma macropomum*, to citronella essential oil (EO) in baths.  
27 However, there is no information as to which major constituent of this oil would be responsible  
28 for the biological and behavioural effects observed in anaesthetized fish, or alternatively, if  
29 such effects could be a result of synergistic action among its phytoconstituents.

30 The major chemical compounds of *C. nardus* are the monoterpenes geraniol and  
31 citronellol, which are responsible for the characteristic odour of the EO (Castro et al., 2010). In  
32 addition to the use of these compounds in various commercial products, including cosmetics  
33 and fragrances, geraniol exerted a broad pharmacological activity as an antiinflammatory,  
34 antioxidant, anti-ulcerative, neuroprotective, acaricidal, and antiseptic agent, inhibiting fungal

1 and bacterial growth (Martins, 2006; Solórzano-Santos and Miranda-Novales, 2012). Moreover  
2 it presented cytoprotective and antioxidant effects in animal models subjected to oxidative  
3 stress (Tiwari and Kakkar, 2009). Citronellol has shown bacteriostatic and bactericidal  
4 activities (Lopez-Romero et al., 2015) as well as antifungal, antispasmodic, analgesic and  
5 anticonvulsant properties (De Sousa et al., 2006; Quintans-Júnior et al., 2008). Although these  
6 compounds are commercially available at relatively affordable prices, there are no studies on  
7 the potential of these isolates as general anaesthetics for fish.

8 Behavioural assessment is usually reported in literature as a standard methodology for  
9 fish anaesthesia evaluation; however, electrophysiological evaluation should be more  
10 frequently used to corroborate such observations as they increase the validity, objectivity, and  
11 consistency of the data. A number of important biological phenomena are accompanied by  
12 cellular electrical manifestations associated with selective ion permeability transport  
13 mechanisms ( $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$ ) participating in the generation of membrane potential in cells.  
14 These ion fluxes are responsible for the electrical transmission in live animals through different  
15 channels, throughout the nervous system and participating in numerous physicochemical and  
16 biomechanical processes such as muscle contraction (Mudado et al., 2003; Delattre, 2007) and  
17 cardiorespiratory function (De Souza et al., 2019). The evaluation of the electromyogram,  
18 electroencephalogram, frequency and cardiorespiratory rhythms allows for a more detailed  
19 understanding of the neuropharmacological phenomena that take place in animals exposed to  
20 general anaesthetics. For more invasive procedures such as surgeries or euthanasia, recordings  
21 of these markers enable the evaluation of the muscle relaxation extent attained and CNS  
22 depression. Cardiorespiratory monitoring throughout and after anaesthesia will allow for a life-  
23 compatibility assessment and shed light on the impacts that might be implicated with these vital  
24 systems (Barbas et al., 2017b; De Souza et al., 2019).

25 Tambaqui, *C. macropomum*, is a native species to the Amazon River, Orinoco and its  
26 tributaries, being a common fish species in floodplain lakes and an economically important fish  
27 to many Northern Latin American countries. It is characterized by its resistance to farming  
28 conditions and diseases, showing good growth rates. Such features were essential for the  
29 improvement of its rearing conditions (Saint-Paul, 1986; Valladão et al., 2016).

30 Different studies have used juveniles of tambaqui in anaesthesia trials (Façanha and  
31 Gomes, 2005; Roubach et al., 2005; Barbas et al., 2016). This species has been reinforced as a  
32 promising in vivo model for tests with novel anaesthetics, in which not only the anaesthetic  
33 potential of herbal products has been evaluated, but also their stress relieving and antioxidant

properties (Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a, 2017b; De Souza et al., 2019; Aydın and Barbas, 2020).

Thus, this study aimed to evaluate the anaesthetic-like properties of geraniol and citronellol in tambaqui juveniles through concentration-response trials and their effects on behaviour, muscle contraction power and cardiorespiratory modulation.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Acquisition of the plant constituents

The oils were purchased from a commercial establishment (AROMACH ingredients™) and stored in amber glass bottles at 4 °C until use. According to the manufacture's information the products were certified for purity as follows: geraniol (GRL) (68.2%) and citronellol (CTL) (96.0%).

### 2.2 Animals and acclimation period

All procedures in this study were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Institute of Para/IFPA – Castanhal – Protocol # 6686081118 (ID 000021).

For this study, juveniles of tambaqui, *Colossoma macropomum* were purchased from a commercial farm with initial average weight of  $3.0 \pm 0.5$  g. Prior to the experiments, animals were acclimated for 30 days to a recirculation system (six 300-L fibre tanks connected to a biofilter), continuously aerated, at a density of 33 fish per tank ( $\sim 0.35$  kg/m<sup>3</sup>) and photoperiod set at 12 h Light: 12 h Dark. Water quality parameters were controlled and maintained as follows: pH  $6.3 \pm 0.6$ , temperature  $28.5 \pm 0.6$  °C and dissolved oxygen  $5.3 \pm 0.4$  mg L<sup>-1</sup> were measured using a multiparameter equipment (HANNA™ HI9828). Total ammonia nitrogen (TAN)  $1.97 \pm 0.29$  mg L<sup>-1</sup> N-NH<sub>3</sub> was determined following methodology of Unesco (1983), nitrite  $0.16 \pm 0.02$  mg L<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub> was evaluated according to Bendschneider and Robinson (1952), and alkalinity ( $57.7 \pm 8.8$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) was evaluated by titration according to Eaton et al. (2005) guidelines.

The feed (commercial feed - 32% protein) was supplied three times daily until satiety.

For the trials, fish were assayed in groups (treatments) for the evaluation of times to anaesthesia and recovery (latencies) (Experiment I) and the effects of the compounds on selected electrophysiological markers (Experiment II) as described ahead.

### 2.3 Experiment I: Behavioural Assessment

Stock solutions of the compounds were prepared by pre-dilution in ethanol (96%) at a 1:9 ratio (oil: ethanol). Thereafter, anaesthetic efficacy of the oils was tested in six concentrations (10; 30; 50; 70; 90; and 110  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) for each compound: GRL and CTL. After acclimation, nine fish ( $24.78 \pm 2.50$  g) per concentration were used and each animal was considered a replicate ( $n = 9$ ). Latencies (in seconds) to anaesthesia and recovery stages were visually assessed and recorded with a digital stopwatch. For the anaesthesia tests, animals were transferred to aquaria (30L) containing 15 L water added by the respective anaesthetic concentration. For recovery evaluation an identical aquarium was used with the same volume of clean water. Fish were observed individually, always by the same observer and used only once. Two control groups (9 animals per group) were monitored in an aquarium similar to the one used in the tests. Sham fish were handled in anaesthetic/ethanol-free water and the other control group was exposed to ethanol-only added water (vehicle control) at a concentration which corresponded to the highest volume used to dilute the highest concentration of oil. The same water from the maintenance tanks was used throughout the behavioural evaluation.

The maximum observation time was 30 min, including the controls. Behavioural cues associated with induction and recovery were characterized according to Park et al. (2008) with modifications as suggested by Barbas et al. (2016): agitation (A1), loss of equilibrium and erratic swimming (A2) and absence of or minimum opercular beating with loss of reaction to tail pinch stimulus (A3) were used as behavioural indicators of anaesthesia induction; erratic swimming and recovery of equilibrium (R1), normal opercular beating and normal swimming (R2) were used as markers to evaluate recovery.

Upon reaching A3 stage, the fish were measured, weighed and immediately transferred to the anaesthetic-free aquarium, for the observation and registration of the different stages of recovery. The water was completely changed and the aquariums were washed after each test. After full recovery (R2), animals were handled back to their maintenance tanks, according to their respective treatments, and monitored for 72 h to check for mortalities.

### 2.4 Experiment II: Electrophysiological Characterization

The concentrations used for the recordings were 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  GRL and 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  CTL, as they promoted deep and fast immobilization, i.e., anaesthesia ( $< 3$  min) (see results in Table 1). For the recordings of the electrical signals and analyses of the acquired data, the methodologies of Barbas et al. (2017a) and De Souza et al. (2019) were followed.

Table 1: Latencies to induction and recovery stages (seconds  $\pm$  SD) in tambaqui, *Colossoma macropomum* juveniles exposed to anaesthetic concentrations of geraniol (GRL) and citronellol (CTL).

| [ $\mu\text{L L}^{-1}$ ] |     | Latencies to stages of induction (s) |                           |                            | Latencies to stages of recovery (s) |                             |
|--------------------------|-----|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
|                          |     | A1                                   | A2                        | A3                         | R1                                  | R2                          |
| GRL                      | 10  | -                                    | -                         | -                          | -                                   | 309 $\pm$ 69                |
|                          | 30  | -                                    | 192 $\pm$ 43 <sup>a</sup> | 528 $\pm$ 163 <sup>a</sup> | 137 $\pm$ 53                        | 313 $\pm$ 78                |
|                          | 50  | -                                    | 104 $\pm$ 32 <sup>b</sup> | 240 $\pm$ 42 <sup>b</sup>  | 169 $\pm$ 59                        | 331 $\pm$ 51                |
|                          | 70  | -                                    | 71 $\pm$ 17 <sup>bc</sup> | 191 $\pm$ 40 <sup>b</sup>  | 146 $\pm$ 49                        | 263 $\pm$ 45                |
|                          | 90  | -                                    | 73 $\pm$ 13 <sup>bc</sup> | 170 $\pm$ 30 <sup>b</sup>  | 189 $\pm$ 41                        | 369 $\pm$ 100               |
|                          | 110 | -                                    | 52 $\pm$ 9 <sup>c</sup>   | 130 $\pm$ 33 <sup>b</sup>  | 179 $\pm$ 96                        | 294 $\pm$ 120               |
| CTL                      | 10  | -                                    | -                         | -                          | -                                   | 449 $\pm$ 125               |
|                          | 30  | -                                    | 153 $\pm$ 55 <sup>a</sup> | 422 $\pm$ 140 <sup>a</sup> | 160 $\pm$ 23 <sup>a</sup>           | 329 $\pm$ 40 <sup>a</sup>   |
|                          | 50  | -                                    | 104 $\pm$ 31 <sup>b</sup> | 293 $\pm$ 84 <sup>b</sup>  | 215 $\pm$ 55 <sup>ab</sup>          | 353 $\pm$ 49 <sup>a</sup>   |
|                          | 70  | -                                    | 79 $\pm$ 23 <sup>b</sup>  | 261 $\pm$ 68 <sup>b</sup>  | 261 $\pm$ 77 <sup>bc*</sup>         | 609 $\pm$ 265 <sup>b*</sup> |
|                          | 90  | -                                    | 87 $\pm$ 18 <sup>b</sup>  | 183 $\pm$ 22 <sup>bc</sup> | 323 $\pm$ 77 <sup>c*</sup>          | 657 $\pm$ 72 <sup>b*</sup>  |
|                          | 110 | 35 $\pm$ 7                           | 67 $\pm$ 19 <sup>b</sup>  | 103 $\pm$ 36 <sup>c</sup>  | 314 $\pm$ 66 <sup>c*</sup>          | 699 $\pm$ 132 <sup>b*</sup> |

Traces denote absence of any stage after a 30 min observation. The times to reach the different stages of induction or recovery are cumulative. Lower case letters in the same column indicate significant differences between concentrations within the same anaesthetic and values with an asterisk indicate significant differences within the same concentrations between anaesthetics (two-way ANOVA, Tukey's test,  $P < 0.05$ ),  $n = 9$ .

The juveniles of tambaqui ( $24.78 \pm 2.50$  g) were assayed into four groups: a) control (basal), b) fish submitted to GRL induction and recovery, c) fish submitted to CTL induction and recovery, and d) fish submitted to ethanol (vehicle control) and recovery (if applicable). Recordings of electromyography (EMG), opercular beat intensity (OBI) and opercular beat rate (OBR), electrocardiography (ECG) and heart rate (HR) were then carried out. Nine fish per electrophysiological recording were used ( $n = 9$ ), including controls and ethanol-exposed fish for each indicator. Mean values for EMG and ECG (including calculations of HR) were obtained from the same animals, and the same procedure was used for the OBI and OBR mean values which were measured in the same group of fish. The same water from the maintenance tanks was used during the recordings.

After recordings, the experimental animals were killed with a blow to the head followed by mechanical destruction of the brain.

## 2.5 Statistical analyses

To verify the homogeneity of variances and normality, data were submitted to Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. After assumptions were met, comparisons of mean latencies for induction and recovery stages were made using two-way ANOVA (with concentrations and anaesthetic being used as factors) followed by Tukey's test. Comparisons

among mean amplitudes (power) of EMG and OBI, mean heart rate (HR) and mean opercular beat rate (OBR) were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. Moreover, Pearson correlation was carried out between times to A3 or R2 stages and increasing concentrations of GRL or CTL. The GraphPad Prism™ 5 software was used for the analyses and the minimum significance level was set at  $p < 0.05$  in all cases (Zar, 1996).

### 3. RESULTS

#### 3.1 Behavioural assessment

Control fish and fish exposed to ethanol (vehicle) did not show any signs of anaesthesia after 30 min observation. No mortality was observed during exposure to the anaesthetics or throughout 72 h in observation. All results for latencies to anaesthesia and recovery are shown in Table 1.

Agitation (A1) was not observed upon exposure to either anaesthetic, except at  $110 \mu\text{L L}^{-1}$  CTL after  $35 \pm 7$  s. For both GRL and CTL exposure, the concentration of  $10 \mu\text{L L}^{-1}$  did not induce A1, A2 and A3 stages, however, mild sedation was attained with resumption of normal swimming (R2) after  $309 \pm 69$  s and  $449 \pm 125$  s for GRL and CTL, respectively. Time to reach A3 stage in group exposed to anaesthesia with GRL was longer at  $30 \mu\text{L L}^{-1}$  ( $528 \pm 163$  s) ( $p < 0.05$ ) relative to the other concentrations within the same anaesthetic. Likewise, the same pattern is observed for CTL exposure, with 90 and  $110 \mu\text{L L}^{-1}$  concentrations showing even lower latencies ( $p < 0.05$ ) compared to other concentrations. Yet, times to reach A3 stage were similar within the same concentrations and between anaesthetics, not showing significant differences.

Regardless of concentration, GRL did not elicit a dose-dependent response after induction, showing no significant differences among mean times in recovery. On the other hand, R2 in CTL-exposed fish was positively correlated with increasing concentrations, being shorter ( $p < 0.05$ ) at 30 and  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  than at the concentrations of 70, 90 and  $110 \mu\text{L L}^{-1}$ . As for the recovery response within the same concentration and between anaesthetics, return times were longer ( $p < 0.05$ ) for CTL-exposed fish at 70, 90 and  $110 \mu\text{L L}^{-1}$ . Irrespective of concentration or time to R2, all fish were considered fully recovered in the behavioural evaluation.

For GRL (Fig. 1A), the higher the concentration of the product, the shorter the induction time (A3) was. The same pattern of induction with CTL was observed (Fig. 1B). On the other hand, during recovery (R2) no clear pattern could be observed, as time for recovery

from GRL exposure did not vary significantly over increasing concentrations. On the other hand, the CTL trial showed a clear opposite correlation in time vs. concentration. In the equations, “y” corresponds to the time required for deep anaesthesia (A3) while “x” corresponds to the GRL and CTL concentrations used.

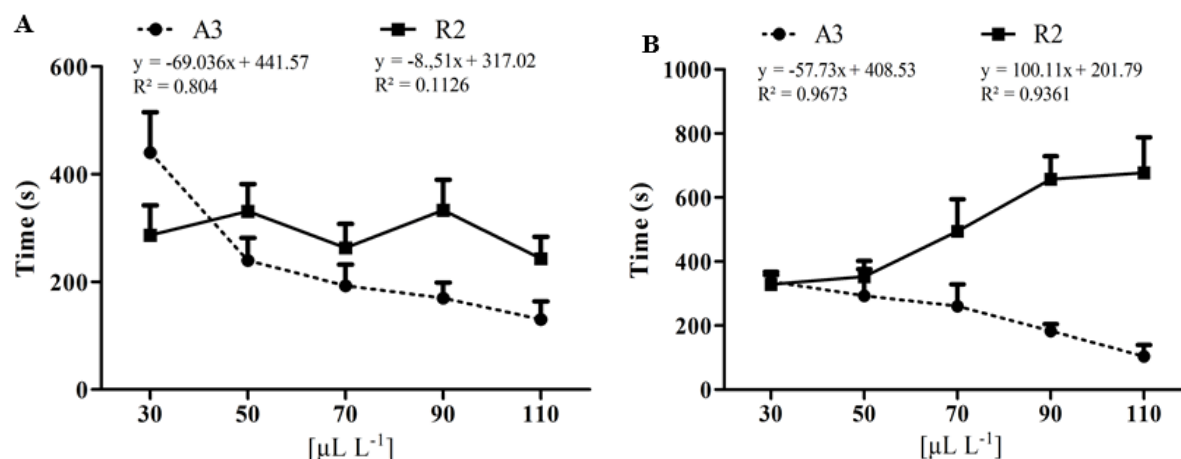


Fig. 1: Trends of induction (A3) and recovery (R2) in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum* exposed to short-term baths with increasing concentrations of geraniol (A) and citronellol (B).

### 3.2 Electrophysiological responses

Since no differences ( $p > 0.05$ ) were observed between mean amplitude and frequency values of the control (basal) and ethanol (vehicle control) groups for any of the measured electrophysiological markers, only mean values of the former (basal) were used for comparison purposes with GRL and CTL-exposed groups.

#### 3.2.1 Electromyography (EMG)

Electromyographic tracings showed continuous activity with intense muscle contraction under normal conditions (Fig. 2A). Signal intensity increased in frequencies up to 20 Hz, as observed in the correspondent frequency spectrogram (Fig. 2B). Mean power amplitude observed in the control (basal values) corresponded to  $7.62 \pm 0.72 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$  (Fig. 3). Dorsal muscle contraction activity is observed in Fig. 2C for GRL-exposed fish, following with myorelaxation after 100 s, as also evidenced by the frequency spectrogram (Fig. 2D). In earlier moments of the induction, i.e., during the first half of the record (Ind I<sub>GRL</sub>) the average amplitude ( $10.67 \pm 0.86 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$ ) was significantly higher than that of the basal group. Mean amplitude significantly reduced to  $0.14 \pm 0.06 \text{ mV}^2 / \text{Hz} \times 10^{-3}$  in the second half of the induction (Ind II<sub>GRL</sub>) as observed in Fig. 3.

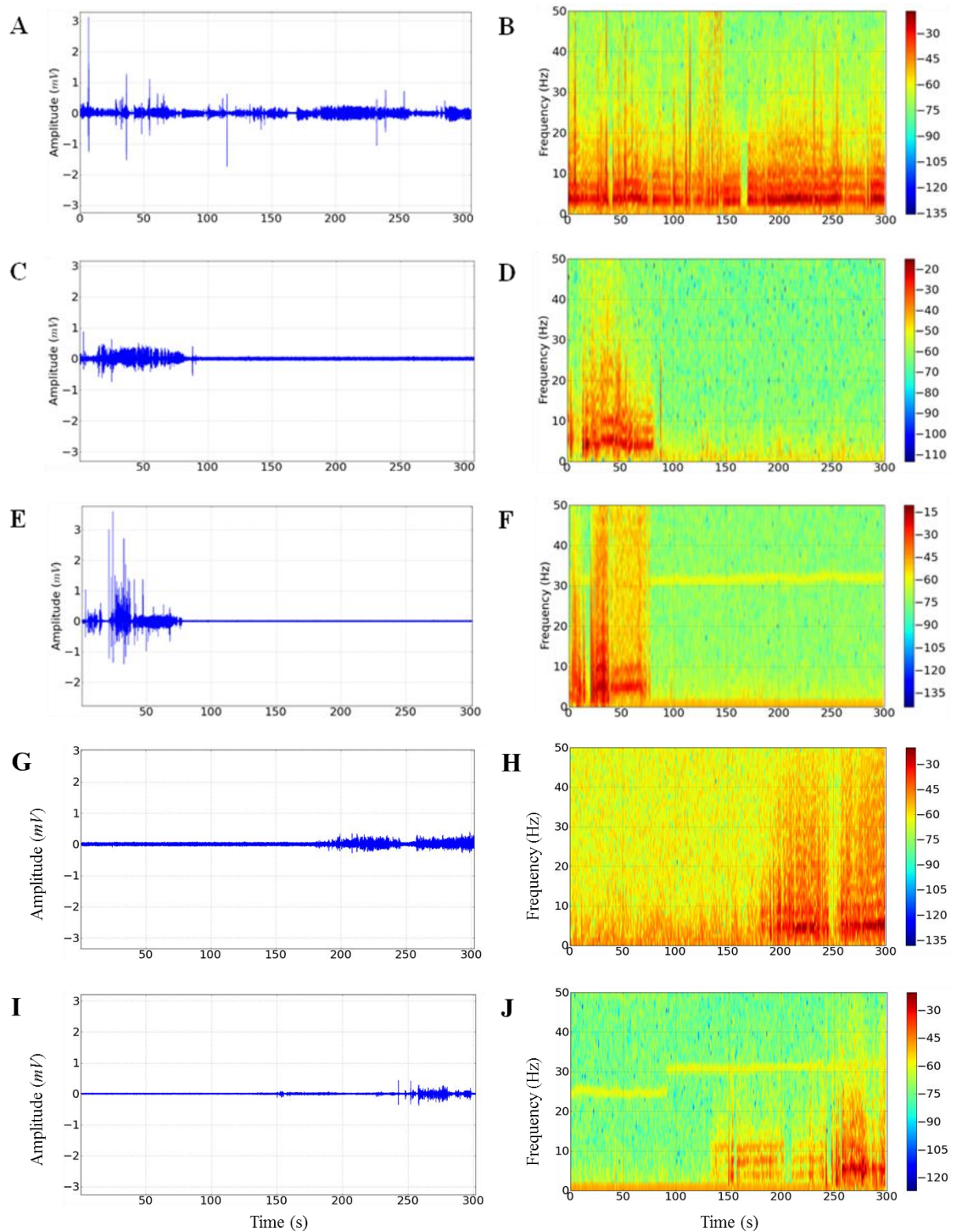


Fig. 2: Electromyographic records (EMG) of tambaqui, *Colossoma macropomum* in the basal state (A and B); submitted to short-term baths with geraniol (GRL) at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  (C and D), citronellol (CTL) at  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  (E and F) and during recovery after anaesthesia with GRL (G and H) and CTL (I and J). Recordings were performed for 300 s. A colorimetric scale is used in the frequency spectrograms whereby the reddish colours indicate a more intense electrical signal over time and across different frequencies.

Differently from GRL, CTL induced a more intense excitability, which is reflected by high amplitude spikes in the first 100 s (Fig. 2E) also corroborated by the intensity of the signal in the colorimetric scale of the frequency spectrogram (Fig. 2F) within the same interval, following with muscle relaxation afterwards. This high mean amplitude is quantified in Fig. 3 with higher averages ( $15.69 \pm 3.23 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ,  $p < 0.001$ ) relative to the control in the first half of the induction (Ind I<sub>CTL</sub>), whereas during the second half of the induction with CTL (Ind II<sub>CTL</sub>), mean amplitude of  $0.26 \pm 0.10 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  was significantly lower ( $p < 0.001$ ) compared to the control and Ind I<sub>CTL</sub>.

During recovery post-anaesthesia low amplitude tracings were initially observed for both products. The resumption of muscle activity progressed over time, and muscle contraction power augmented during the second half of the tracings (Fig. 2G and I), as also evidenced by the frequency spectrograms in both cases (Fig. 2H and J). Mean amplitude of tracings for the whole recovery interval were  $5.99 \pm 1.15$  and  $2.63 \pm 0.92 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  for GRL and CTL-exposed fish, respectively, thus returning ( $p > 0.05$ ) to basal values. Further, it was clear that mean amplitudes increased significantly during recovery as it can be seen when mean values were compared against values during Ind II in both cases (Fig. 3).

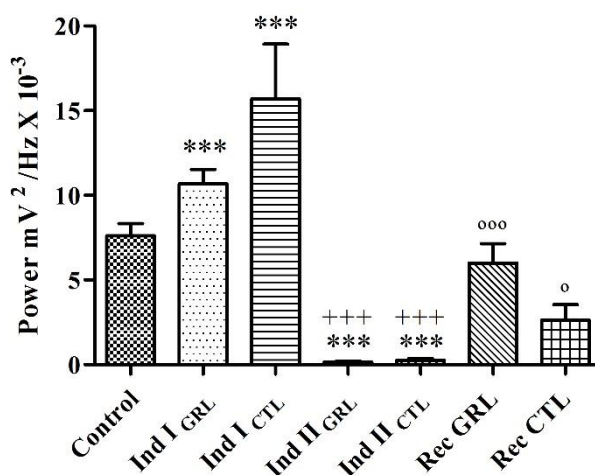


Fig. 3: Mean amplitudes recorded in the electromyogram (EMG) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings performed for 300 s in the controls, fish undergoing anaesthetic baths with GRL at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$ , CTL at  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  and in recovery post-anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). The Ind I and Ind II periods correspond to the mean amplitude within standardized intervals from 1 to 150 s and 150 to 300 s, respectively. \*\*\* Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind I to control; +++ Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind II to Ind I within the same anaesthetic; ° Indicates significant differences (°,  $p < 0.05$ ; °°°,  $p < 0.001$ ) in Recovery compared to Ind II relative to the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].

### 3.2.2 Opercular Beat Intensity (OBI) and Opercular Beat Rate (OBR)

The tracings in the control group (Fig. 4A) showed constant and regular waves, also corroborated by the pattern attained in the frequency spectrogram (Fig. 4B) during normal beats. The mean power in the control was  $3.29 \pm 0.71 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  (Fig. 5A) while OBR was calculated to be at  $114.2 \pm 4.74 \text{ bpm}$  (Fig. 5A and B).

Upon contact with GRL and within the 150 s of the recordings, a transient apnea was observed, followed later on by an adaptation to a regular beating (Fig. 4C). This reduction in amplitude can be confirmed by the respective mean OBI value  $0.52 \pm 0.16 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  (Fig. 5A). Nevertheless, the OBR in Ind I<sub>GRL</sub> is higher ( $p < 0.05$ ) ( $122.8 \pm 4.06 \text{ bpm}$ ) than that of the basal group, and the frequency spectrogram (Fig. 4D) showed higher intensity of the signal mainly in frequencies below 10 Hz. However, during Ind II<sub>GRL</sub>, OBR decreased to  $62.44 \pm 7.27 \text{ bpm}$  ( $p < 0.001$ ) compared to the control and compared to the first half of the induction period (Fig. 5B).

CTL decreased the opercular beat power throughout the induction period (Fig. 4E) which was reduced ( $p < 0.001$ ) relative to basal recordings (Fig. 5A). A more irregular distribution and less intense signal can be seen in the CTL frequency spectrogram (Fig. 4F). Although a reduced mean amplitude value for OBI was recorded ( $0.27 \pm 0.10 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ) compared to the control, the mean OBR was  $121.8 \pm 6.67$  during Ind I<sub>CTL</sub>, being unchanged compared to the control. Later, during Ind II<sub>CTL</sub>, the rate reduced to  $62.44 \pm 7.27 \text{ bpm}$  ( $p < 0.001$ ) relative to the control (Fig. 5B).

During recovery, both products proved to be reversible. However, GRL seemed to allow for a faster recovery of the movements (Fig. 4G) as tracings showed a relative greater amplitude and better energy distribution in the frequency spectrogram (Fig. 4H) compared to the CTL's spectrogram as per the colour pattern attained (Fig. 4J). The OBI mean values were higher ( $p < 0.001$ ) compared to induction values for both products,  $1.79 \pm 0.41$  and  $1.39 \pm 0.18 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$  for GRL and CTL, respectively (Fig. 5A). Moreover, increased OBRs ( $p < 0.001$ ) for GRL ( $88.44 \pm 2.40 \text{ bpm}$ ) and CTL ( $78.44 \pm 6.62 \text{ bpm}$ ) during recovery were also observed compared to mean OBRs in the second half of the induction in either case (Fig. 5B).

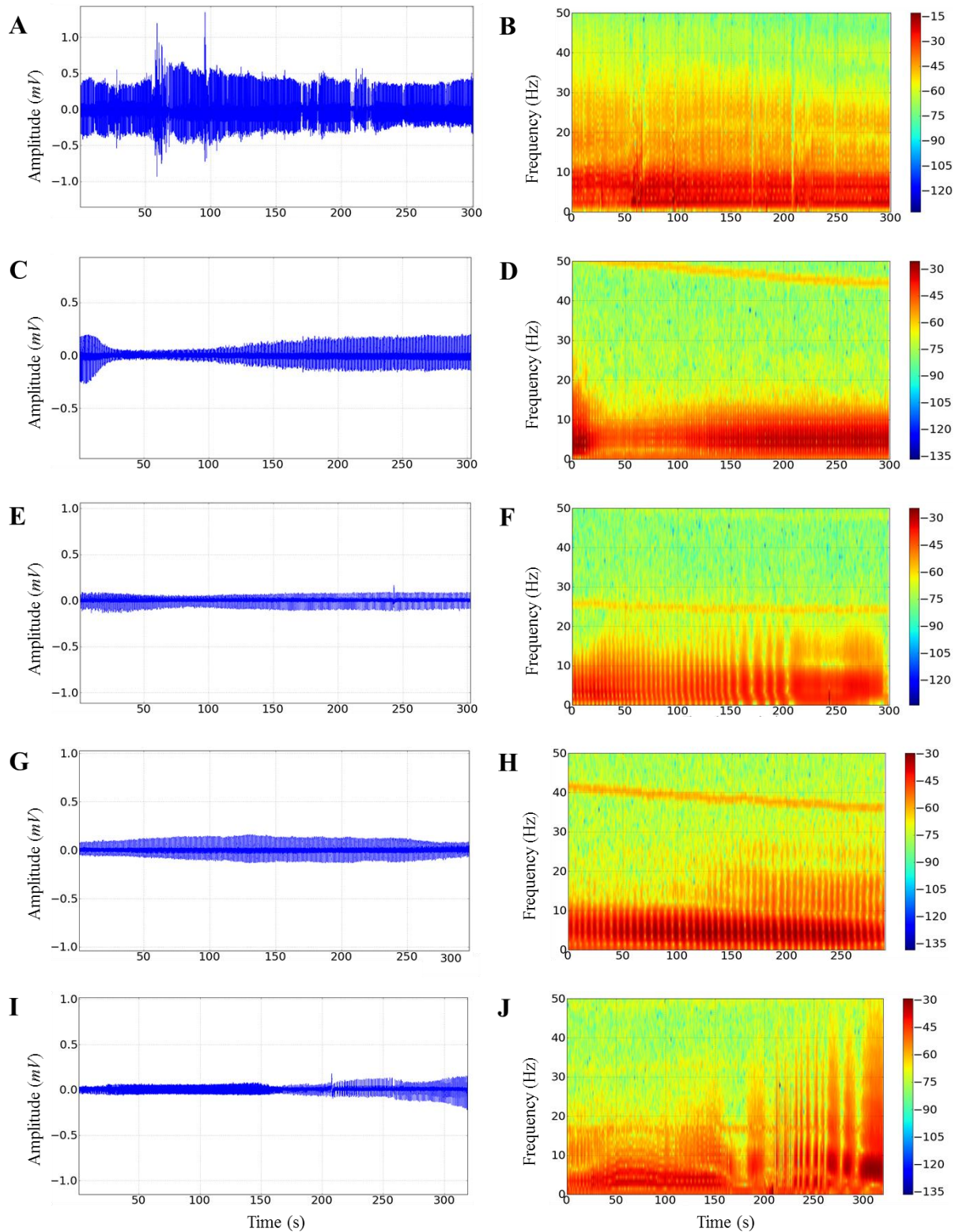


Fig. 4: Opercular beat intensity (OBI) records of tambaqui, *Colossoma macropomum* in the basal state (A and B), submitted to baths with geraniol (GRL) at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  (C and D) and citronellol (CTL) at  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  (E and F) and during recovery after anaesthesia with GRL (G and H) and CTL (I and J). Recordings were performed for 300 s. A colorimetric scale is used in the frequency spectrograms whereby the reddish colours indicate a more intense electrical signal over time and across different frequencies.

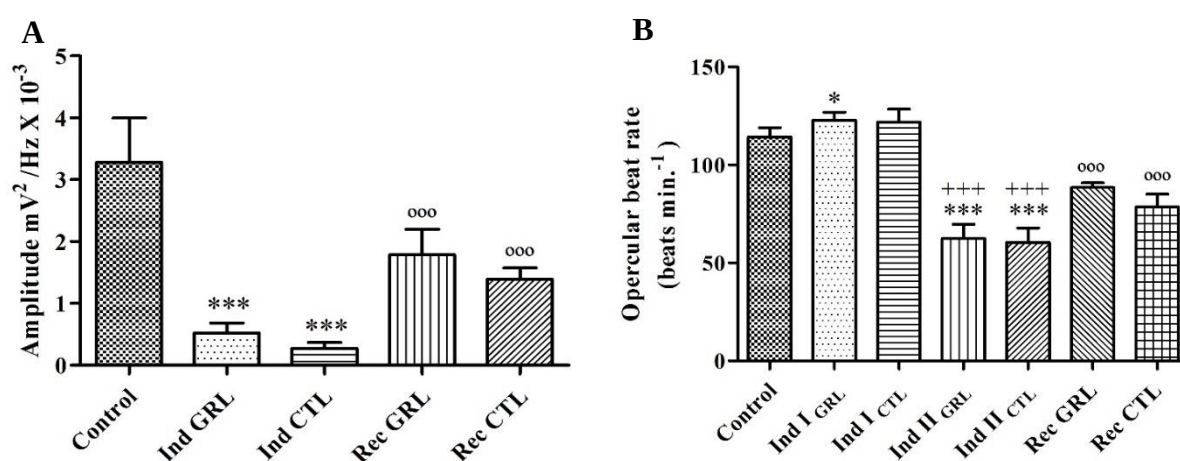


Fig. 5: Record of mean amplitude of opercular beat intensity (OBI) (A) and opercular beat rate (OBR), in beats per minute (bpm) (B) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings made in 300 s in the controls, fish submitted to anaesthetic baths with GRL at 70  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CTL at 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  and during recovery after anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). The Ind I and Ind II periods correspond to the average amplitude of standardized intervals from 1 to 150 s and 150 to 300 s, respectively. \* Indicates significant differences (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ) from Ind I to control; +++ Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) from Ind II to Ind I within the same anaesthetic; ooo Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) of Recovery in relation to Ind II within the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].

### 3.2.3 Electrocardiographic recordings (ECG)

The basal electrocardiogram of tambaqui is presented in Fig. 6A. Fig. 6B presents a 2-s snapshot, showing the P wave, QRS complex and T wave. The average beat rate was  $104.0 \pm 4.00$  bpm in sham fish.

During the induction with GRL, heart rate decreased, but the amplitude of the ECG tracings was maintained, as can be seen by the regularity of the P and T waves and the amplitude of QRS complex (Fig. 6C and D). The mean frequency of heart beats in GRL-exposed fish was  $59.56 \pm 3.58$  bpm, which was lower ( $p < 0.001$ ) compared to the control group. Upon recovery, there was a gradual reversibility of the effect with return of amplitude without major changes in the tracings and maintenance of sinus rhythm (Fig. 6E and F), with an increase of heart rate to  $70.22 \pm 2.73$  bpm ( $p < 0.001$ ) in relation to the induction response (Fig. 7).

On the other hand, during induction with CTL some arrhythmia was observed, showing irregularities in the tracings, reduced amplitude, elevation of the T wave and distortion of the QRS complex at some points (Fig. 6G and H). Upon contact with CTL, a decreased heart rate  $48.44 \pm 2.19$  bpm was observed relative to the control ( $p < 0.001$ ) (Fig. 7). During recovery,

a reduced amplitude (Fig. 6I and J) and a significantly depressed heart rate ( $56.00 \pm 2.45$  bpm) was still observed ( $p < 0.001$ ) compared to responses during induction (Fig. 7).

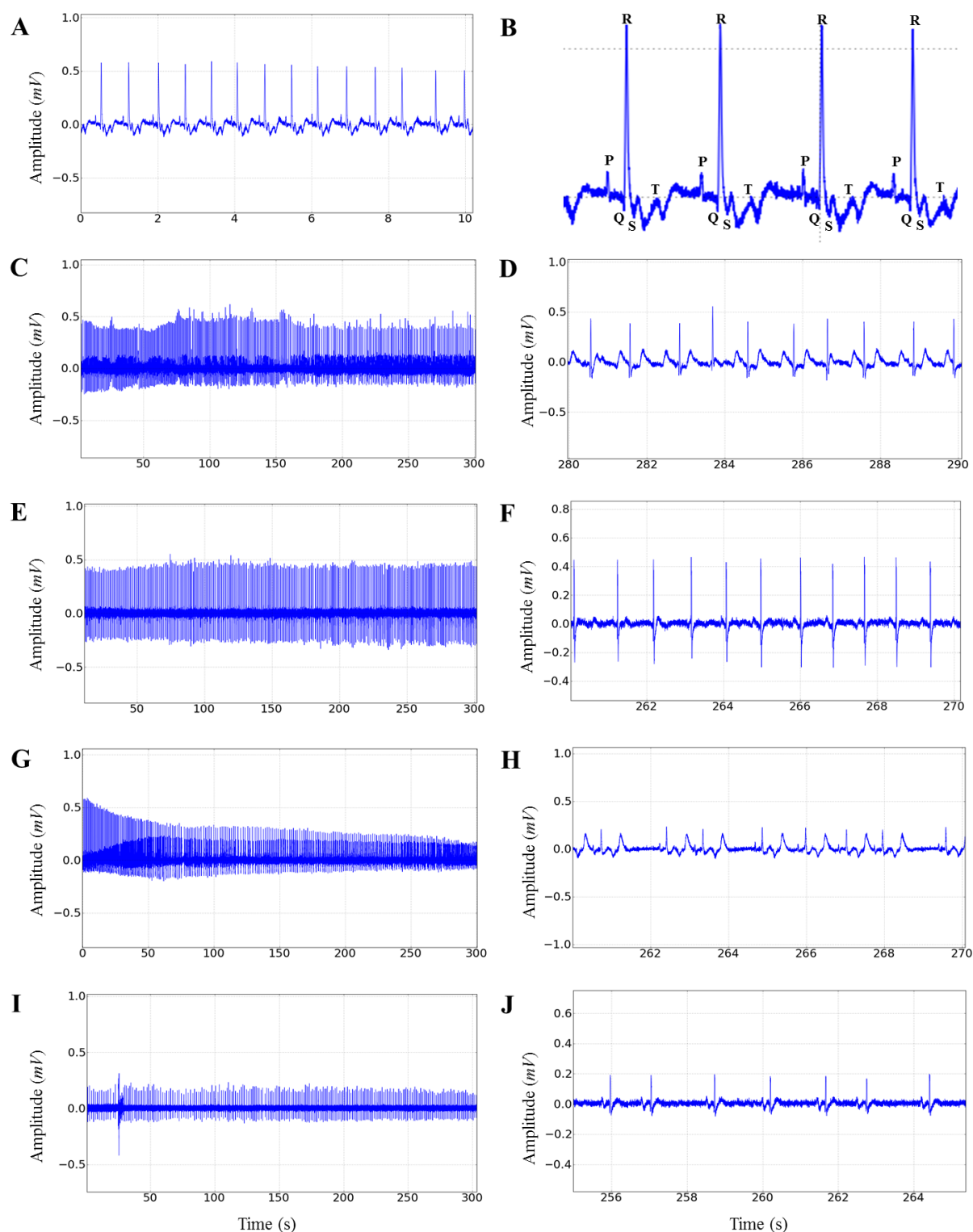


Fig. 6: Normal electrocardiographic (ECG) tracings of tambaqui *Colossoma macropomum* (10 s) (A) and 2-s snapshots showing the P and T waves, and the QRS complex (B); and fish undergoing short-term baths with geraniol (GRL) at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  (C and D) and during recovery after anaesthesia (E and F), citronellol (CTL) at 90

$\mu\text{L L}^{-1}$  (G and H) and during recovery after anaesthesia (I and J). Recordings were all performed for 300 s (left panels) showing 10-s fragment amplifications (right panels except for B panel).

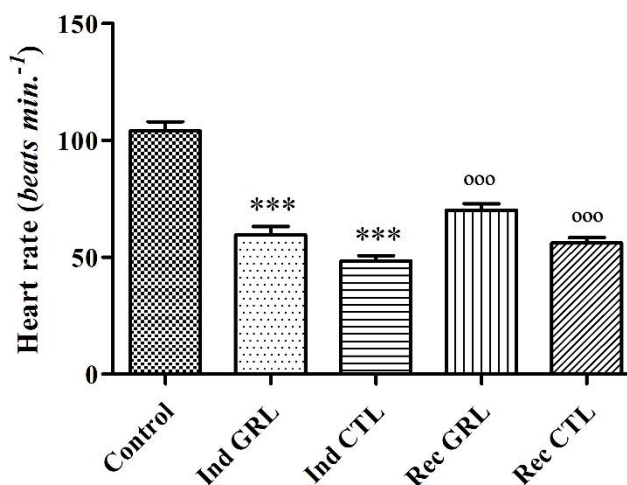


Fig. 7: Heart rate (HR), in beats per minute (bpm) of *Colossoma macropomum* juveniles submitted to anaesthesia with geraniol (GRL) and citronellol (CTL). Recordings made in 300 s in the controls, fish submitted to anaesthetic baths with GRL at  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  (Ind GRL), CTL at  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  (Ind CTL) and during recovery post anaesthesia (Rec GRL and Rec CTL). \*\*\* Indicates significant differences ( $p < 0.001$ ) of Induction relative to the control; ooo Indicates significant differences (ooo,  $p < 0.001$ ) of Recovery in relation to Induction within the same anaesthetic, [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].

#### 4. DISCUSSION

Throughout exposure, both products induced a reversible full body immobilization and significantly modulated electrophysiological responses with distinctive characteristics. GRL and CTL did not elicit agitated behaviour during exposure except for the concentration of  $110 \mu\text{L L}^{-1}$  in the latter. Although anaesthetic induction should preferably occur with low or no hyperactivity, such a reaction is commonly observed in animals exposed to anaesthetic baths with different substances, as reported in other studies (Gomes et al., 2001; Ross and Ross, 2008; Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019).

Anaesthetics act on the fish CNS, which are usually anaesthetized in baths added with products that can be rapidly absorbed through the gills and thus enter the bloodstream (Ross and Ross, 2008). The time to render fish anaesthetized is important as it can influence the stress response and a long induction time can negatively impact recovery (Sladky et al., 2001; Woody et al., 2002; Zahl et al., 2009; Barbas et al., 2016). Ideally, an anaesthetic should induce rapid immobilization and allow for a fast recovery in an as much as possible stress-free condition. Our findings showed that induction time was inversely correlated with concentration, which

corroborates other similar studies on fish (Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a; Fujimoto et al., 2017; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019).

Concentrations of 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  GRL and 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  CTL were sufficient to render fish fully immobilized in approximately three minutes, and thus complying with the guidelines as proposed for fish anaesthesia (Ross and Ross, 2008; Barbas et al., 2017a, 2017b). Compounds used in this study are the major components of the *C. nardus* essential oil, and concentrations used herein were much lower than those reported by Barbas et al. (2017a) when investigating the effects of citronella essential oil as an anaesthetic for *C. macropomum* juveniles. While the citronella essential oil at 600  $\mu\text{L L}^{-1}$  was recommended as a suitable concentration to promote fast and deep anaesthesia in *C. macropomum*, our findings suggest that a 6.5 to 8.5-fold reduction in concentration for an effective anaesthesia is possible when using these isolated citronella essential oil derivatives. Thus, it could represent reduction of costs depending on the technology used for the oil extractions.

Regardless of anaesthetic concentration, induction time may vary among specimens, which could be related to variations in the rate of water flow across the gills (Treves-Brown, 2000) and the level of anaesthetic depression depending on the purpose of the procedure (biometrics, surgery, transportation and others). Herein, concentrations of 30  $\mu\text{L L}^{-1}$  and above induced all stages of anaesthesia for either product, however, the animals showed distinct responses during recovery.

While GRL promoted timely recovery irrespective of the concentration used, the group exposed to CTL oil had longer recovery periods, i.e., more than 5 min to resumption of normal swimming in anaesthetic-free water, and thus not complying with the time threshold criteria for recovery. Recovery time response was inversely proportional to induction time and directly correlated to increments in concentration. However, prediction of fish recovery after anaesthesia is always an issue, as several studies have reported irregular responses during that stage (Mylonas et al., 2005; Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019).

Electrophysiological responses seemed to be consistent with a general anaesthetic effect. According to the EMG data, there were clear differences in muscle contraction power in the first half of the induction, showing excitability during exposure in both cases in relation to the basal group. When under anaesthesia, fish are expected to show CNS depression and increased muscle relaxation, which in turn will lead to reduced motor coordination, and impairing the righting reflex and normal swimming behaviour. During the second half of the record the oils promoted loss of muscle tonus with general immobilization, as corroborated by

1 the low amplitude in tracings, which were overlapped by A3 stage. These results are in line  
2 with those reported by De Souza et al. (2019) working with *Nepeta cataria* essential oil in *C.*  
3 *macropomum* juveniles and by Fujimoto et al. (2017) who reported a depression in muscle  
4 contraction power in fish anaesthetized with clove oil.

5 Reversibility of the effects occurred for both products as per the EMG tracing patterns  
6 observed during recovery. Overall, there was a gradual and progressive recovery in muscle  
7 contraction power post-exposure, showing partial reversibility of the muscular tonus without  
8 indication of excitability or spasms throughout the recordings. Mean amplitude values for  
9 REC<sub>CTL</sub> are below basal and REC<sub>GRL</sub> values, indicating the need for a longer time for  
10 resumption of the muscle contraction power as also reported in other studies using the same  
11 species as a model (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019).  
12 Indisputably, these results show that the myorelaxant effects of GRL and CTL are reversible.

13 Both anaesthetics reduced the power and frequency of the opercular beat throughout  
14 the first half of the recovery. In animals exposed to GRL, the OBI decreased by 84.17% during  
15 induction and OBR by 45.33% during the second half of the record. For the group in contact  
16 with CTL, the OBI was much lower (91.66%) compared to the control, and the reduction in  
17 OBR was in the order of 47.08% during second half of the induction. These results are expected  
18 in view of the synchronization that occurs between beat power and frequency. Water flow  
19 depends on the opercular beat, which in turn is essential for an effective gas exchange across  
20 blood and water. As total suppression of ventilation did not occur during baths, severe hypoxia  
21 does not seem to represent a threat to life of fish submitted to short-term exposure using these  
22 compounds.

23 The HR in GRL-exposed fish during induction was 42.74% lower than that of the  
24 control. The tracings were continuous and regular, allowing for a progressive return of the HR  
25 during recovery, with no signs of arrhythmias. Reductions in HR of tambaqui were observed in  
26 other studies using different anaesthetics (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019).

27 Although either isolate significantly decreased heart rates, it did not compromise  
28 resumption of normal cardiac function. However, CTL caused a more severe depression of the  
29 cardiac function with mild arrhythmia. Barbas et al. (2017a) and De Souza et al. (2019)  
30 observed transient arrhythmia during recovery of juvenile tambaqui exposed to essential oil of  
31 citronella and propofol, respectively. Similarly to our findings, both studies also showed  
32 reduction in the OBI. As the flow occurs to the benefit of the arteries, a combination of central  
33 and peripheral control of cardiorespiratory interactions is capable of generating synchronization

1 between respiration and the heart function, with a component related to breathing through the  
2 vagal nerve innervating to the heart (Taylor, 1992; Taylor et al., 1999).

3 Geraniol has the ability to inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  currents and prevent arrhythmic effects on the  
4 atrial tissue (De Menezes-filho et al., 2014). It could explain our findings, since the control of  
5 the heart rate in fish is exerted by the action potentials of the sinoatrial node, i.e., activities  
6 generated by the pacemaker tissue in the heart, which involves the activation of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  
7  $\text{Ca}^{2+}$  channels, where  $\text{K}^+$ -induced contractions are inhibited by blocking  $\text{Ca}^{2+}$  channels or by  
8 removing  $\text{Ca}^{2+}$  to the external environment and therefore are dependent on the  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes.

9 Rhythmic oscillations occurred in animals exposed to CTL. In this group, bradycardia  
10 was observed during the induction period ( $48.44 \pm 2.19$  bpm) with a reduction of 53.42% in  
11 relation to the control, which remained depressed throughout the recovery period ( $56.00 \pm 2.45$   
12 bpm). This is likely related to the partial blockade of voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channels induced  
13 by CTL, resulting in the stabilization of excitable membranes, since voltage-dependent  $\text{Na}^+$   
14 channels are a major contributor to rapid membrane depolarization (De Sousa et al., 2006). It  
15 has been previously reported that this isolated compound determined significant cardiovascular  
16 effects, whereas the bradycardic condition can improve cardiac contractility as an adaptive  
17 response during anaesthesia (Schwerte et al., 2006; Bastos et al., 2009; Menezes et al., 2010;  
18 Santos et al., 2011).

19 The effects of monoterpenes can occur by various mechanisms due to their structural  
20 diversity, as they can be cyclic or acyclic molecules. In addition, changes in vagal tone affect  
21 heart rate, and this increase affects bradycardia (Taylor et al., 2010) which is associated with  
22 hypoventilation. As suggested by De Souza et al. (2019), these events may occur due to an  
23 indirect consequence of central neuronal depression or a result of the direct depressant effect  
24 of anaesthetics in the cardiac and respiratory tissues. Presumably, their vasodilatory action  
25 appears to be caused by an inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  influx across the plasma membrane, as studies  
26 have concluded that the use of these monoterpenes promotes hypotensive and bradycardic  
27 activity (De Sousa et al., 2006; Bastos et al., 2009).

28 In summary, the present study discussed some effects caused by CTL and GRL at the  
29 behavioural and physiological levels in an attempt to make sense of any deleterious implications  
30 that could be involved during exposure to these substances. Moreover, the importance of  
31 pursuing more specific indicators, such as EEG recordings, could shed more light on the  
32 potential of these substances to cause CNS depression in fish. Future studies should focus on a  
33 more prolonged monitoring of fish undergoing anaesthesia and recovering from exposure to  
34 these compounds to further characterize responses in muscle or any late impacts on cardiac

function, especially in the case of exposure to CTL including the characterization of the ECG complex and waves.

## 5. CONCLUSION

In conclusion, our results showed that geraniol and citronelol were able to promote full body immobilization, which resulted at least in part, from the myorelaxant properties of these citronella-derived compounds. Concentrations of 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  GRL and 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  CTL were sufficient to render fish fully and rapidly immobilized. Both products transiently reduced ventilation during anaesthesia, nevertheless allowing for complete recovery after exposure. Although either isolate significantly decreased heart rates, they did not compromise resumption of normal cardiac function. In general, as no mortalities were observed and all animals recovered after exposure, both products could be considered safe alternatives for fish handling and other aquaculture-related activities that might require short-term fish immobilization.

## Author statement

Conceptualization and formal analyses: E.R.L.A., M.F.T., C.B.A., L.A. L.B., M.H. and L.A.S.; Data curation: E.R.L.A., J.S.S., L.M.L., B.M.P.A.C., L.A.L.B. and M.H.; Writing – original draft: E.R.L.A., L.A.L.B., M.F.T. and M.H. All authors contributed equally to the review & editing of this manuscript's final version.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

E.R.L.A is grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Brazilian CAPES) for the scholarship provided. Authors are also thankful to students and staffs of the Tropical Species Aquaculture Laboratory (LAET/IFPA – Castanhal) and Natural Products Toxicology Laboratory (UFPA – Belém) for their technical support during the experiments. L.A.S is a research fellow of the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq, Brazil.

## REFERENCES

- Aydın, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 1–9. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734681>
- Barbas, L.A.L., Stringhetta, G.R., Garcia, L.O., Figueiredo, M.R.C., Sampaio, L.A., 2016. Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. *Aquaculture* 456, 70–75. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.026>
- Barbas, L.A.L., Hamoy, M., De Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., De Lima, H.D.S.T., Torres, M.F., Do Nascimento, L.A.S., Da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017a. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture* 479, 60–68. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.027>
- Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., de Garcia, L.O., Monserrat, J.M., da Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2017b. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469, 79–87. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.012>
- Bastos, J.F., Moreira, I.J., Ribeiro, T.P., Medeiros, I.A., Antonioli, A.R., De Sousa, D.P., Santos, M.R., 2009. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 106, 331–337. DOI [10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00492.x)
- Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87–96.
- Castro, H.G., Perini, V.B.M., Santos, G.R., Leal, T.C.A.B., 2010. Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. *Rev. Ciênc. Agron.* 41, 308–314. DOI <https://doi.org/10.1590/S1806-66902010000200020>
- Cotter, P.A., Rodnick, K.J., 2006. Differential effects of anaesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 145, 158–165. DOI [10.1016/j.cbpa.2006.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.001)
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac. Res.* 31, 537–546. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00478.x>
- De Menezes-Filho, J.E.R., Gondim, A.N.S., Cruz, J.S., De Souza, A.A., Santos, J.N.A., Conde-Garcia, E. A., Sousa, D.P., Santos, M.S., Oliveira, E.D., Vasconcelos, C. M. L., 2014. Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful effects to treat arrhythmias. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 115, 534–544. DOI [10.1111/bcpt.12274](https://doi.org/10.1111/bcpt.12274)
- De Sousa, D.P., Gonçalves, J.C.R., Quintans-Júnior, L., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., Almeida, R.N., 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci. Lett.* 401, 231–235. DOI [10.1016/j.neulet.2006.03.030](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.030)
- De Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., De Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.017>
- Delattre, E., 2007. Fundamentos de eletrofisiologia: potenciais de membrana. 40, 378–393.
- Façanha, M.F., Gomes, L.C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). *Acta Amaz.* 35, 71–75.

- 1 Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard Methods for the  
2 Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association,  
3 Springfield. (8p.).
- 4 Fujimoto, R.Y., Pereira, D.M., Silva, J.C., Oliveira, L.C.A.O., Inoue, L.A.K.A., Hamoy, M.,  
5 Mello, V.J., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2017. Clove oil induces anaesthesia and blunts  
6 muscle contraction power in three Amazon fish species. *Fish Physiol. Biochem.* 44, 245–  
7 256. DOI <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>
- 8 Gomes, L.C., Chippari-Gomnes A.R., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R.M.,  
9 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma*  
10 *macropomum*. *J. World Aquac. Soc. Baton Rouge* 32, 426–431. DOI  
11 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x>.
- 12 Gonçalves, A.F.N., Santos, E.C.C., Fernandes, J.B.K., Takahashi, L.S., 2008. Menthol and  
13 eugenol as benzocaine substitutes in anesthetic induction of pacu juveniles. *Acta Sci.*  
14 *Anim. Sci.* 30, 339–344. DOI [10.4025/actascianimsci.v30i3.1081](https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v30i3.1081)
- 15 Inoue, L.A.K.A., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., Moraes, G., 2005. Effects of clove oil on the  
16 stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amaz.* 35, 289–  
17 295. DOI <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>.
- 18 Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A., Simões, M., 2015. Antibacterial effects  
19 and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia*  
20 *coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid.-Based Compl. Alt.* 2015, 1-9. DOI  
21 <https://doi.org/10.1155/2015/795435>.
- 22 Losey, G.S., Hugie, D.M., 1994. Prior anesthesia impairs a chemically mediated fright response  
23 in a gobiid fish. *J. of Chem. Ecol.* 20, 1877-1883. DOI  
24 <https://doi.org/10.1007/BF02066229>.
- 25 Mahalwal V.S, Ali M., 2003. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle.  
26 *Flavour Fragr. J.* 18, 73–76. DOI <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1144>.
- 27 Martins R.M., 2006. Estudio “in vitro” de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea  
28 citronela de java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*.  
29 *Rev. Bras. Plantas Med.* 08, 71–78.
- 30 Menezes, I.A.C., Barreto, C.M.N., Antonioli, A.R., Santos, M.R.V., De Sousa, D.P., 2010.  
31 Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *Z Naturforsch. C. J. Biosci.* 65,  
32 562–566. DOI [10.1515/znc-2010-9-1005](https://doi.org/10.1515/znc-2010-9-1005).
- 33 Mudado, M.A., Moreira, T.H., Cruz, J.S., 2003. O início da era dos canais iônicos. *Clínica Hoje*  
34 33, 56–58.
- 35 Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy  
36 of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass  
37 (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different  
38 temperatures. *Aquaculture* 246, 467–481. DOI [10.1016/j.aquaculture.2005.02.046](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.046).
- 39 Park, M.O., Hur, W.J., Im, S.Y., Seol, D.W., Lee J., Park, I.S., 2008. Anaesthetic efficacy and  
40 physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*.  
41 *Aquac. Res.* 39, 877–884. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>.
- 42 Park, J-Y., Kim, J-Y., Jang, S-H., Kim, H-J., Lee S-J, Park, S-C., 2015. Biological activities  
43 and acute oral toxicity of citronella and lemongrass oil. *Korean J. Vet. Res.* 55, 13–20. DOI  
44 <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.1.13>.
- 45 Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., De Souza, D.M., Martins, Á.C., Garcia L.O.,  
46 Wasielesky, W.Jr., Monserrat J.M., Schmidt, D., Caron, B.O., Heinzmann, B.,  
47 Baldisserotto, B., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia*  
48 *alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei*  
49 (Crustacea, Penaeidae). *Comp. Biochem. Phys. C* 155, 462–8. DOI  
50 [10.1016/j.cbpc.2011.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003).

- 1 Quintans-Júnior, L.J., Souza, T.T., Leite, B.S., Lessa, N.M.N., Bonjardim, L.R., Santos,  
2 M.R.V., Blank, A.F., Antonioli, A.R., 2008. Phytochemical screening and anticonvulsant  
3 activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents.  
4 Phytomedicine 15, 619–24. DOI [10.1016/j.phymed.2007.09.018](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.018).
- 5 Roubach, R., Gomes, L.C., Fonseca, F.A.L., Val, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious  
6 anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). Aquac. Res. 36, 1056–1061.  
7 DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x>.
- 8 Ross, L.G., Blanco, J.S., Martínez-Palacios, C., Racotta, I.S., Cuevas, M.T., 2007. Anesthesia,  
9 sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and  
10 hypothermia. Aquac. Res. 38, 909–917. DOI [10.1111/j.1365-2109.2006.01642.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01642.x)
- 11 Ross, L.G., Ross, B., 2008. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals.  
12 Blackwell Publishing, Oxford, UK. (228 p).
- 13 Saint-Paul, U., 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review.  
14 Aquaculture 54, 205–240. DOI [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90329-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90329-7).
- 15 Santos, M.R.V., Moreira, f.v., Fraga, B.P., De Sousa, D.P., Bonjardim, L.R., Quintans-Júnior,  
16 L.J., 2011. Cardiovascular effects of monoterpenes: A review. Rev. Bras. Farmacog. 21, 4,  
17 764–771. DOI [10.1590/S0102-695X2011005000119](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000119).
- 18 Schwerte, T., Prem, C., Mairösl, A., Pelster, B., 2006. Development of the sympatho-vagal  
19 balance in the cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) characterized by power  
20 spectrum and classical signal analysis. J. Exp. Biol. 209, 1093–1100. DOI  
21 [10.1242/jeb.02117](https://doi.org/10.1242/jeb.02117)
- 22 Sladky, K.K. Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001.  
23 Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in  
24 red pacu (*Piaractus brachypomus*). Am. J. Vet. Res. 62, 337–342. DOI  
25 <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>.
- 26 Sneddon, L.U., 2012. Clinical anesthesia and analgesia in fish. J. Exot. Pet Med. 21, 32–43.
- 27 Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as  
28 antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 136–141. DOI  
29 [10.1016/j.copbio.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005).
- 30 Sylvester, J.R., 1975. Factors influencing the efficacy of MS-222 to striped mullet (*Mugil*  
31 *cephalus*) Aquaculture 6, 163–169. DOI [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(75\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(75)90067-8).
- 32 Taylor E.W., 1992. Nervous control of the heart and cardiorespiratory interactions. In: Hoar,  
33 W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Editors), Fish physiology. Vol. XIIB. New York:  
34 Academic Press; 343–387.
- 35 Taylor, E.W., Jordan, D., Coote, J.H., 1999. Central control of the cardiovascular and  
36 respiratory systems and their interactions in vertebrates. Physiol Rev. 79, 855–916. DOI  
37 [10.1152/physrev.1999.79.3.855](https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.855).
- 38 Taylor, E.W., Leite, C.A.C., Skovgaard, N., 2010. Autonomic control of cardiorespiratory  
39 interactions in fish, amphibians and reptiles. Brazilian J. Med. Biol. Res. 43, 600–610. DOI  
40 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500044>.
- 41 Tiwari, M., Kakkar, P., 2009. Plant derived antioxidants-geraniol and camphene protect rat  
42 alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. Toxicol. in Vitro 23, 295–  
43 301. DOI [10.1016/j.tiv.2008.12.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.014).
- 44 Treves-Brown, K.M., 2000. Anaesthesia. Em: Treves-Brown, K.M. (Ed.), Anaesthetics in  
45 Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 206–  
46 217.
- 47 Unesco, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and  
48 Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. France, Paris.
- 49 Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental  
50 aquaculture. Rev. in Aquacult., 10, 351–369. DOI <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.

- 1 Vilhena, C.S., Nascimento, L.A.S., Andrade, E.H.A., Silva, J.K.R., Hamoy, M., Torres, M.F.,  
2 Barbas, L.A.L., 2019. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like  
3 state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*.  
4 Aquaculture, 510, 169–175. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.057>.  
5 Woody, C.A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye  
6 salmon-field trials. J. Fish Biol. 60, 340–347. DOI [10.1006/jfbi.2001.1842](https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1842).  
7 Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Hansen, M.K., 2009. Anaesthesia of Atlantic cod  
8 (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight,  
9 temperature and stress. Aquaculture 295, 52–59. DOI [10.1016/j.aquaculture.2009.06.019](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.019).  
10 Zar J.H., 1996. Biostatistical analysis, 3rd ed. New Jersey, USA: Prentice-Hall. 662 p.

## CAPÍTULO 2

### **Shifting patterns in cardiac response of tambaqui *Colossoma macropomum* exposed to short-term baths using geraniol and citronellol**

Ednara Ronise L. de Araújo<sup>a</sup>, Marcelo F. Torres<sup>c</sup>, Moisés Hamoy<sup>b\*</sup>, Luis André L. Barbas<sup>c\*\*</sup>,  
Luís André Sampaio<sup>a\*\*\*</sup>,

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Rio Grande – RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal – PA, Brazil

\* Correspondence to: M. Hamoy, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará, UFPA Campus Belém, Rua Augusto Corrêa nº 01 Guamá, CEP 66075–110 Belém, PA, Brazil.

\*\* Correspondence to: L. A. Sampaio, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Instituto de Oceanografia, CP 474, CEP 96201–900 Rio Grande, RS, Brazil.

\*\*\* Correspondence to: L. A. L. Barbas, Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, IFPA Campus Castanhal, BR 316, Km 63 S/N, CEP 68740–970 Castanhal, PA, Brazil.

E-mail addresses: hamoyufpa@gmail.com (M. Hamoy), sampaio@mikrus.com.br (L.A. Sampaio), andre.barbas@hotmail.com (L.A.L. Barbas).

Manuscrito submetido à revista *Aquaculture* (em fase final de revisão pelos revisores).

**Fator de impacto: 5.135**

## Abstract

Electrocardiographic recordings (ECG) provide information on the duration of the action potential and the heart rhythm. Altered ECG may reflect important disturbances to the cardiac function. The aim of this study was to evaluate putative cardiotoxic effects in *Colossoma macropomum* upon exposure to geraniol (GRL – 70  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) and citronellol (CTL – 90  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) in anaesthetics baths. The fish were randomly distributed across the following treatments: a) control (basal recordings), b) vehicle control (ethanol), c) fish exposed to GRL – 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and subsequent recovery, and d) fish exposed to CTL – 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  and subsequent recovery, and e) washout from ethanol. Five minute long recordings were used. The parameters heart rate (HR) (beats  $\text{min}^{-1}$ ), amplitude record (mV), R-R interval (s), Q-T interval (s) and QRS duration (s) were investigated. No mortality was observed and all animals recovered post exposure. The controls and ethanol-exposed fish presented normal patterns in ECG tracings showing sinus rhythm. Some alterations were observed during induction, e.g., a negative chronotropic effect was observed in fish exposed to GRL, however, with maintenance of the sinus rhythm. Only the Q-T interval was longer than that of the controls. On the other hand, during induction with CTL, marked bradycardia with arrhythmia and prolongation of the Q-T and R-R intervals and QRS complex duration were observed, indicating a potential for atrioventricular blockade. During recovery, albeit slow, all parameters returned to sinus rhythm, suggesting that although important cardiac changes occurred during induction, mostly with CTL, they proved to be reversible. In conclusion, both anaesthetics provoked cardiac alterations without compromising the recovery, which proved to be fast and effective. Such findings lend more credence to geraniol and citronellol to be used as fish anaesthetics.

**Keywords:** Electrocardiogram, anaesthetic, biomarker, phytoconstituent, ECG

## 1. INTRODUCTION

The evaluation of anaesthesia efficacy in fish should go beyond the sole recording of time to reach full body immobilisation and recovery. The assessment of behavioural markers alone does not allow for the verification of general anaesthesia, analgesia or myorelaxation (Barbas et al., 2017a). Moreover, the safety of the anaesthetic procedure, e.g. through characterization of cardiorespiratory response should not be overlooked (De Souza et al., 2019; Araújo et al., 2021; Cantanhêde et al., 2021). Other biomarkers can be monitored to prevent deleterious physiological effects to occur in fish submitted to anaesthesia.

Despite the growing number of studies evaluating the potential of essential oils (EO) and their isolated compounds as anaesthetics for fish (Aydın and Barbas, 2020), little efforts have been directed to the characterization of undesired side effects and margin of safety. In addition to behavioural assessment and fish survival, many other implications of anaesthesia should be considered. Clove EO, for instance, presents eugenol as its main active constituent (Jirovetz et al., 2006) and is widely used in aquaculture (Inoue et al., 2003; Mylonas et al., 2005; Roubach et al., 2005; Aydın and Barbas, 2020). Although clove oil or eugenol (as an isolate) continue to be proposed as suitable products for use in fish (Fujimoto et al., 2017; De Oliveira et al., 2019; Wang et al., 2019), they should always be carefully scrutinized as several adverse effects such as seizure-like neuronal excitability (Barbas et al., 2021), ventilatory failure, neurotoxic and hepatotoxic effects (Sladky et al., 2001) and cardiorespiratory failure (Cotter and Rodnick, 2006) have also been reported in eugenol-exposed fish. effects such as seizure-like neuronal excitability (Barbas et al., 2021), ventilatory failure, neurotoxic and hepatotoxic effects (Sladky et al., 2001) and cardiorespiratory failure (Cotter and Rodnick, 2006) have also been reported in eugenol-exposed fish.

The depression of the central nervous system (CNS) is a direct consequence of general anaesthesia, which can affect cardiac and respiratory function and lead to bradycardia or even cardiorespiratory arrest during or after exposure to the anaesthetic (Zahl et al., 2012; Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Araújo et al., 2021; Cantanhêde et al., 2021). Thus, the characterization of the electrocardiogram (ECG) is important to identify changes in action potentials reflected by tracing patterns that might suggest cardiotoxicity.

The characterizations encompass descriptions of the QRS complex duration which represents the depolarization of the ventricle and the propagation of the cardiac impulse, whereby Q is a negative wave that precedes an ascending R wave and subsequently, a descending S wave; also the duration of the Q-T intervals, which is the time from the first activation to the last repolarization of the ventricular myocardium, and also the duration of the R-R interval, in which the distance between two successive R waves depends on the heart rate (HR) (Yoshikawa et al., 1988; Keating and Sanguinetti, 2001; Harmer et al., 2011; Xing et al., 2017).

The ECG markers have been increasingly used as complementary information in the evaluation of the anaesthetic efficacy of plant extracts and isolated compounds in live fish, proving to be a reliable and safe tool (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Araújo et al., 2021; Cantanhêde et al., 2021). A recent study using menthol, which is a compound obtained

from the EO of mint (*Mentha* spp.), confirmed its anaesthetic effect in juveniles of tambaqui (*Colossoma macropomum*) without impairment of cardiac function at doses of 40 and 60 mg L<sup>-1</sup>, presenting reversible cardiac depression (Cantanhêde et al., 2021). This reversibility in cardiac depression has also been reported by Barbas et al. (2017a), De Souza et al. (2019) and Araújo et al. (2021) using this same fish species exposed to EO of *Cymbopogon nardus* (citronella), *Nepeta cataria* (catnip), geraniol and citronellol (citronella EO-derived compounds).

Geraniol and citronellol are monoterpenes found in the EO of several medicinal plants such as *C. nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* and *Lippia alba* (Bastos et al., 2010; Castro et al., 2010). These plants have stood out for their pharmacological effects showing anticonvulsant, antinociceptive, antibacterial, antiarrhythmic, hypotensive and vasorelaxant effects (De Sousa et al., 2006; Quintans-Júnior, 2008; Bastos et al., 2010; De Menezes-Filho et al., 2014; Lopez-Romero et al., 2015), also presenting promising anaesthetic properties in fish (Araújo et al., 2021).

Tambaqui (*C. macropomum*) fish stands out for its good growth rate and resistance to diseases and high tolerance to low concentrations of dissolved oxygen, being the most reared native species in Brazil and other Latin American countries (Inoue et al., 2011; Valladão et al., 2016; Valenti et al., 2021). This species has been used as a promising model to evaluate new natural anaesthetic candidates (Façanha and Gomes, 2005; Roubach et al., 2005; Inoue et al., 2011; Pádua et al., 2013; Barbas et al., 2016, 2017a, 2017b; Saccol et al., 2017; Baldisserotto et al., 2018; Santos Batista et al., 2018; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019; Araújo et al., 2021; Cantanhêde et al., 2021).

Therefore, considering the potential properties of geraniol and citronellol as anaesthetics for fish, and the lack of detailed information on the effects of these compounds on the cardiac function, the aim of this study was to provide a thorough assessment of the cardiac effects of these compounds in tambaqui juveniles submitted to short-term baths.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Animals and acclimation period

Juveniles of tambaqui, *Colossoma macropomum* were acquired from a commercial farm after induced spawning. Upon arrival, fish were stocked in aquariums at the Bioterium of the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products at the Universidade Federal

do Pará (UFPA) under controlled room temperature (25 a 28 °C) and photoperiod fixed at 12 h L: 12 h D. Feeding was carried out twice a day with commercial feed (32% protein) until satiety. The water was partially renewed every day (approximately 20% of the aquarium volume) with dechlorinated tap water from the same source. During the acclimation period (15 days), the water quality variables Temperature:  $26.8 \pm 0,7$  °C, Dissolved Oxygen (DO):  $5.3 \pm 0.4$  mg L<sup>-1</sup> and pH:  $7.5 \pm 0.3$  were measured using a multiparameter equipment (HANNA™). Total ammonia nitrogen (TAN):  $0.1 \pm 0.07$  mg L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NH<sub>3</sub><sup>-</sup> – N were quantified according to Unesco (1983).

## 2.2 Anaesthetic preparation and conservation

The oils and dosages used were in accordance with those determined in a previous study by Araújo et al. (2021). Briefly, stock solutions were prepared using a pre-dilution of the oils in ethanol (96%) at a ratio of 1:9, from which aliquots were taken for the ECG trials. The stock solution was added directly to the aquarium water at concentrations of 70 and 90 µL L<sup>-1</sup> for geraniol and citronellol, respectively. The ethanolic solutions were stored in amber glass vials at 4 °C, until use.

## 2.3 Experimental Design

The tambaqui juveniles ( $13.9 \pm 1.4$ g) were randomly distributed across the following treatments: a) control (basal recordings), b) vehicle control (ethanol), c) fish exposed to geraniol (GRL) and subsequent recovery, and d) fish exposed to citronelol (CTL) and subsequent recovery, e) washout from ethanol. Nine fish were used for each recording (n = 9 per treatment). EEG analyses were carried out for 5 minutes during expose and recovery.

### 2.3.1 Electrocardiogram (ECG) Recordings and Analyses

ECG recordings were performed inside a Faraday cage (TMC™) and the acquired data were later analysed following the same methodology reported for other studies of our research group (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Cantanhêde et al., 2020; 2021).

Briefly, for the monitoring, the electrodes were built in stainless steel rods with 0.3 mm in diameter and 5.0 mm in length. The affixation of the reference electrode followed the indication of the cardiac vector, being ventrally affixed, 0.2 mm after the opercular cavity end whereas the recording electrode was inserted 2.0 mm below the pectoral fin. Subsequently, the electrodes were connected to a high impedance amplifier. Parameters analysed consisted of

mean values for heart rate (in beats min<sup>-1</sup>), wave amplitude (mV), R-R interval (s), Q-T interval (s) and QRS duration (s).

After recordings, the experimental animals were killed with a blow to the head followed by mechanical destruction of the brain.

The electrodes were connected to a digital data acquisition system using a high impedance differential amplifier (Grass Technologies, Modelo P511), adjusted with 0.3 and 300 Hz filterings, with 2000X amplification and monitored by an oscilloscope (ProteK, Modelo 6510). The Records were continuously digitized at 1 KHz (National Instruments, Austin, TX) and stored on a hard disk for later processing using a specialized software (LabVIEW express).

The analysis of the acquired signals was performed through the programming language Python version 2.7. The Numpy and Scipy libraries were used for mathematical data processing and the Matplotlib library was used for graphing. The graphical interface was developed using the library PyQt4. The amplitude graphs present the potential differences between the reference and recording electrodes. The record signals were observed at 1000 samples per second.

#### 2.4 Statistical analyses

Assumptions of normality and homogeneity of variances were made using the Kolmogorov-Sminov and Levene tests, respectively. Comparisons of mean power values were made using one-way ANOVA, followed by the Tukey's test. The software GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 was used for the analyses and a p<0.05 value was considered statistically significant in all cases.

### 3. RESULTS

#### 3.1 Electrocardiogram (ECG) and Heart Rate (HR) during induction

No mortality occurred during induction with GRL and CTL or during recovery. The ECG of tambaqui in the basal group and ethanol-exposed group are shown in Fig. 1 and 2, respectively, also with details on the QRS complex and description of the corresponding waves (Fig. 1B and 2B). All cardiac parameters for these groups were considered normal and regular. The T wave indicates ventricular repolarization and the QRS complex represents the depolarization of the ventricle, whereby the Q wave is negative and precedes an ascending R wave, followed by a descending S wave that represents the depolarization of the ventricle. After the initial 150 s of the exposure with either substance, changes were observed in the tracings as shown by the 2s-amplification records (Fig. 3 A and B).

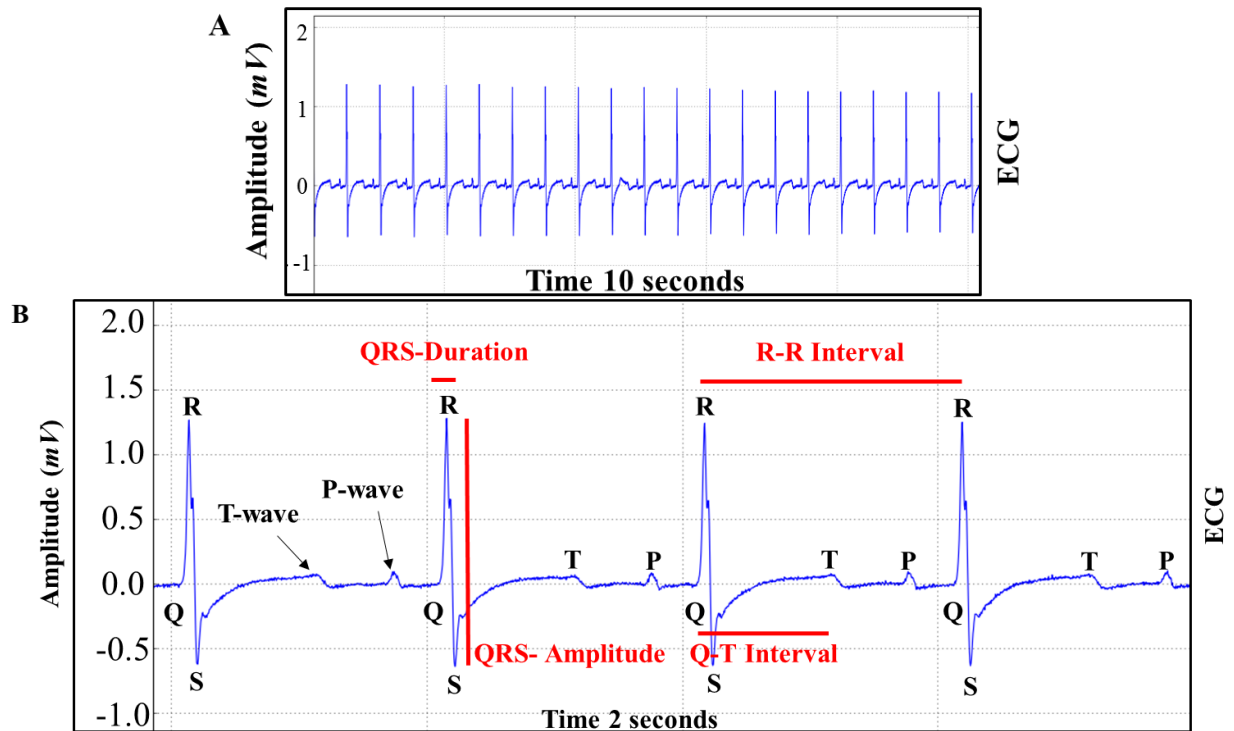


Fig. 1. Normal electrocardiographic (ECG) recording of Tambaqui, *Colossoma macropomum* in the Basal group with sinus rhythm in 10s (A) and 2s amplification demonstrating P, T waves, duration of R-R and Q-T intervals and QRS complex amplitude (B).

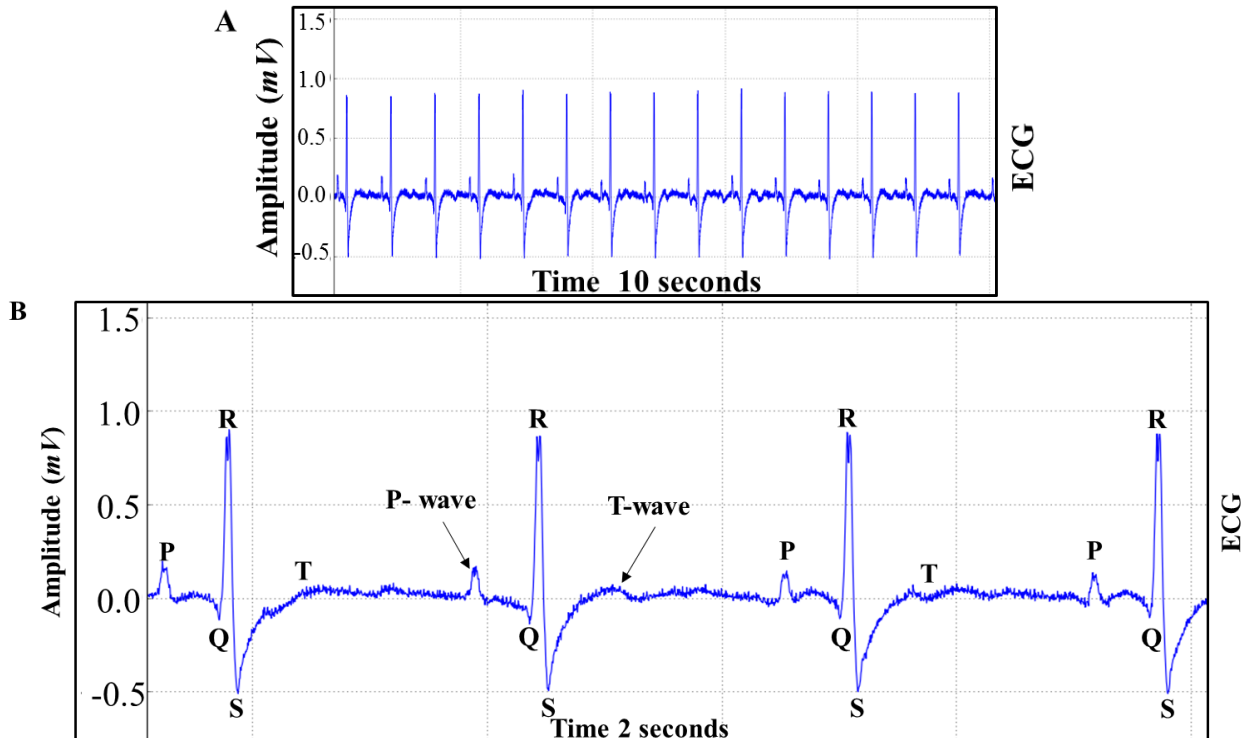


Fig. 2. Electrocardiographic (ECG) recording of Tambaqui, *Colossoma macropomum* during contact with Ethanol (A), and 2s amplification demonstrating P, T waves, duration of R-R and Q-T intervals and QRS complex amplitude (B).

The HR in the controls was regular ( $102 \pm 4$  beats  $\text{min}^{-1}$ ) and mean power (amplitude) was  $1.11 \pm 0.09$  mV. On the other hand, ethanol-exposed fish had a mean frequency of  $93 \pm 6$  beats  $\text{min}^{-1}$ , which was lower ( $p < 0.05$ ) than the controls, however, no significant differences in amplitudes were observed ( $1.28 \pm 1.58$  mV) (Fig. 4A and B).

There were variations in the tracings upon exposure to the anaesthetics. For the GRL group, the HR was  $90 \pm 4$  beats  $\text{min}^{-1}$ , showing a difference in relation to the basal group ( $p < 0.05$ ) with amplitude reaching  $0.72 \pm 0.07$  mV lower ( $p < 0.05$ ) when compared to the control and ethanol-exposed fish (Fig. 4A and B), however a sinus rhythm was maintained (Fig. 3A). Differently, fish exposed to CTL showed changes in the ECG pattern, evidenced in the amplification of the tracings in Fig. 3B. This group showed a sharp drop in HR ( $49 \pm 5$  beats  $\text{min}^{-1}$ ) and amplitude ( $0.21 \pm 0.01$  mV) much lower ( $p < 0.05$ ) when compared to the other groups.

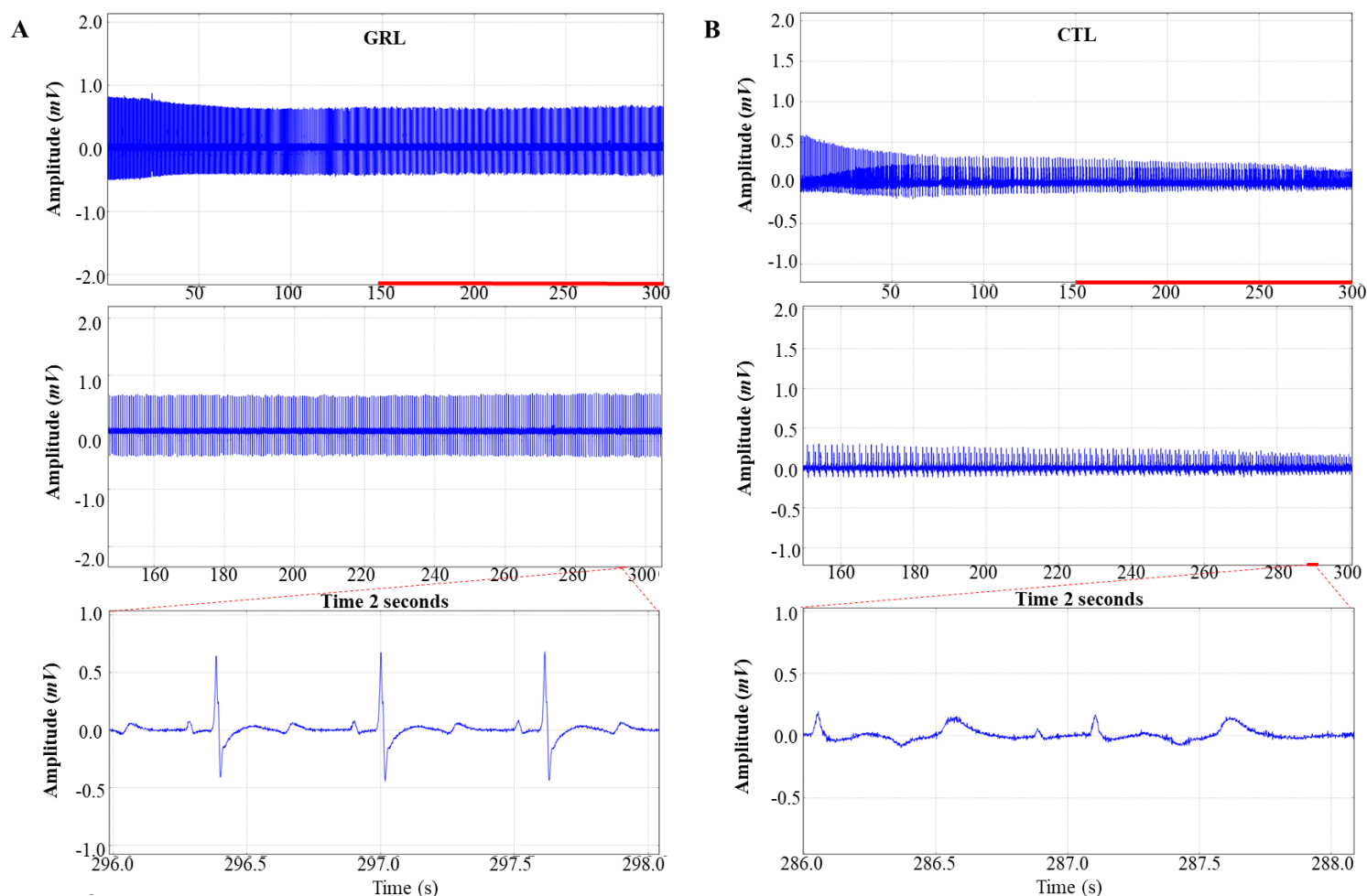


Fig. 3. Electrocardiographic recording (ECG) of Tambaqui, *Colossoma macropomum* upon contact with Geraniol (GRL)  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL)  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ , with a total duration of 5 minutes, the red line indicates the tracing that was evaluated with magnification of the last 150 seconds of exposure with either substance and 2-second magnification of the tracing demonstrating the ECG components.

The interval between R-R waves remained regular in the controls, with an average of  $0.50 \pm 0.03$  s (Fig. 4C); and the time to start ventricular depolarization (Q wave) and ventricular repolarization (T wave) represented by the Q-T interval (Fig. 4D) was  $0.27 \pm 0.01$  s. The duration of the QRS complex was  $0.03 \pm 0.00$  s (Fig. 4E). In the ethanol control, these parameters did not differ in relation to the basal control, and maintained the sinus rhythm, with an R-R interval of  $0.67 \pm 0.01$  s, Q-T interval of  $0.28 \pm 0.04$  s and QRS duration of  $0.04 \pm 0.00$  s.

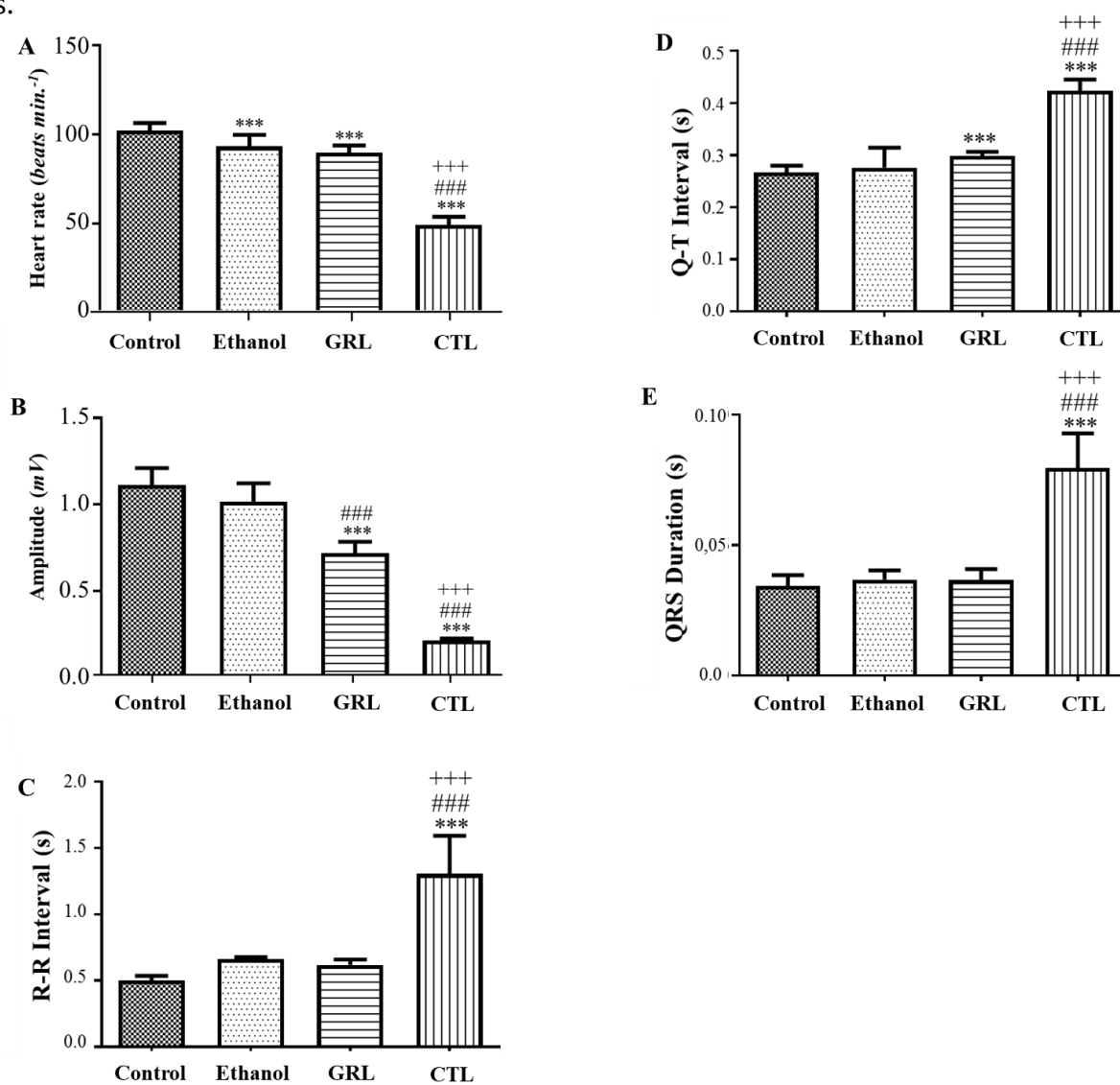


Fig.4. Mean values recorded in the control group, vehicle control (ethanol), (GRL)  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL)  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  in juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum* during 5 minutes of induction, showing comparisons between means of electrocardiographic heart rate (beats min.<sup>-1</sup>) recordings (A); Amplitude averages (mV) (B); Comparison between R-R interval means (seconds) (C); Evaluation of Q-T interval means (seconds) (D); Evaluation of the average duration of the QRS complex (seconds) (E). \*\*\* indicates statistical difference for the control; ### indicates statistical difference for the control group Ethanol; +++ Indicates statistical difference for the geraniol group. [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].

Upon exposure to GRL, the distances between the R waves were maintained, as well as the QRS duration, with averages of  $0.62 \pm 0.04$  and  $0.04 \pm 0.00$  s, respectively. Only the Q-T interval ( $0.30 \pm 0.01$  s) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to the controls. However, all parameters changed in fish exposed to CTL, differing ( $p < 0.05$ ) from the other groups, showing averages for R-R interval of  $1.31 \pm 0.29$  s, QT interval of  $0.42 \pm 0.02$  s and duration of the QRS complex of  $0.08 \pm 0.01$  s.

### 3.2 Electrocardiogram (ECG) and Heart Rate (HR) during recovery

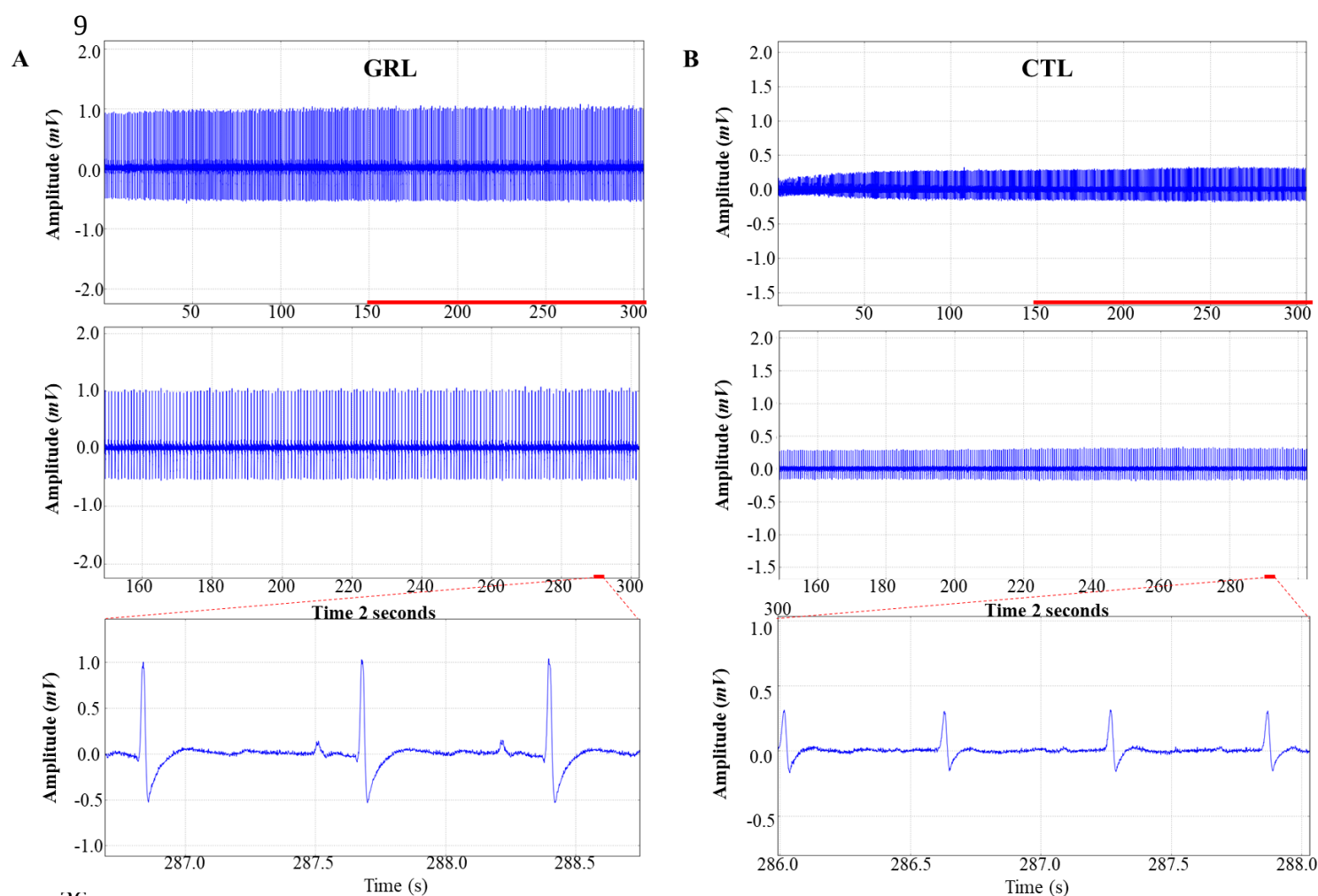


Fig. 5. Electrocardiographic recording (ECG) of Tambaqui, *Colossoma macropomum* in 5-min recovery after (GRL) 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL) 90  $\mu\text{L L}^{-1}$  exposure. The red line indicates magnification of the last 150 seconds of exposure with the substances and 2-second magnification of the tracing demonstrating the ECG components.

No differences were observed between the controls during recovery, and ECG recordings were performed only for ethanol control, which remained no significant differences in relation to the basal group, and presenting HR values, mean amplitude, R-R and Q-T intervals and QRS duration of  $97 \pm 5 \text{ beats min}^{-1}$ ,  $1.05 \pm 0.12 \text{ mV}$ ,  $0.52 \pm 0.04 \text{ s}$ ,  $0.27 \pm 0.01 \text{ s}$  and  $0.03 \pm 0.00 \text{ s}$ , respectively. However, for animals exposed to GRL and CTL, a gradual return to normal ECG was observed (Fig. 5A and B).

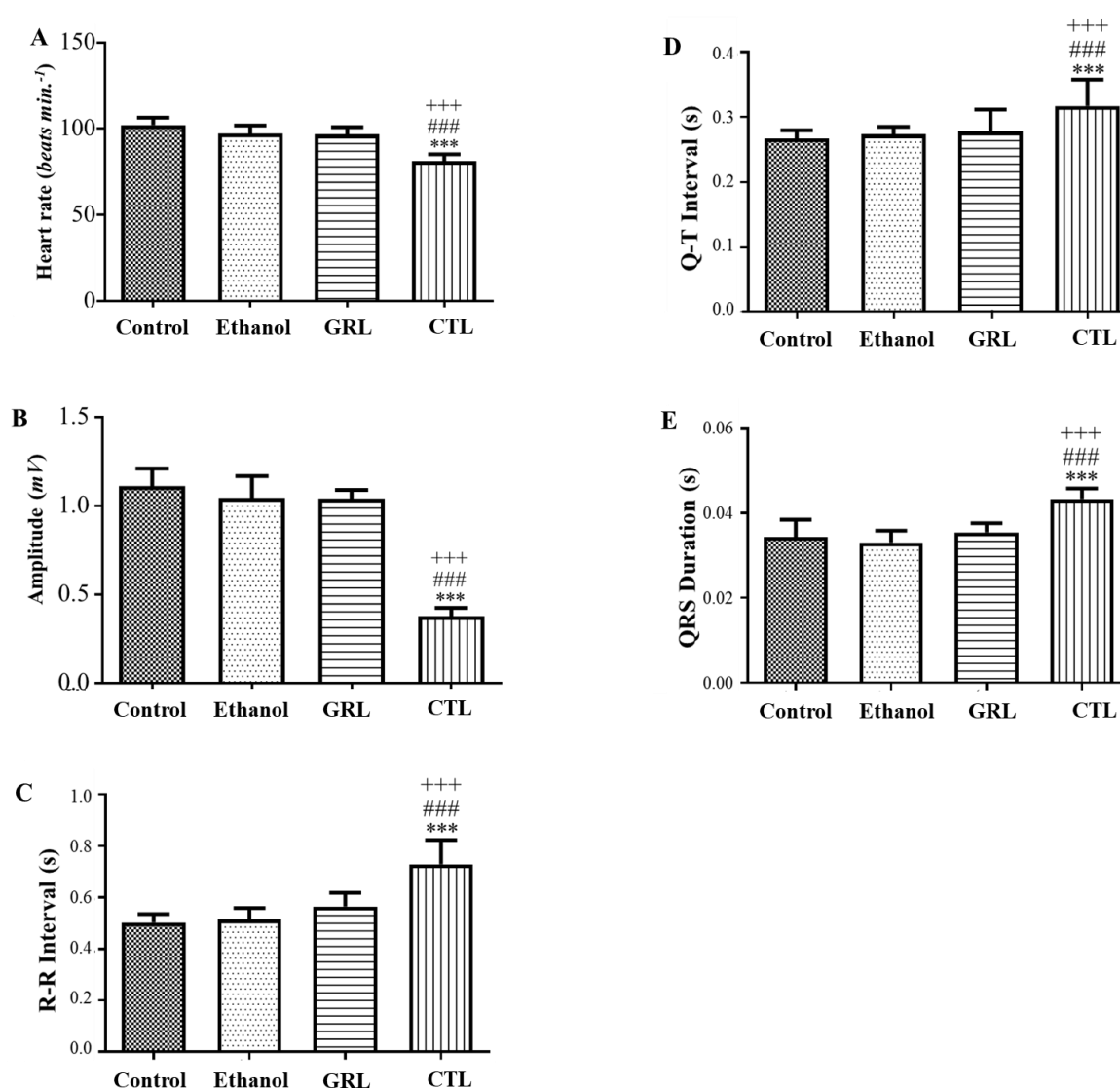


Fig. 6. Mean values recorded in the control group, vehicle control (Ethanol), (GRL)  $70 \mu\text{L L}^{-1}$  and Citronellol (CTL)  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  in juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum* during 5 minutes in recovery. Comparisons were made between means of electrocardiographic heart rate (beats min<sup>-1</sup>) recordings (A); Amplitude averages (mV) (B); Comparison between R-R interval means (seconds) (C); Evaluation of Q-T interval means (Seconds) (D); Evaluation of the average duration of the QRS complex (seconds) (E). \*\*\* Indicates statistical difference from the

controls; ### Indicates statistical differences from the Ethanol control group; \*\*\* Indicates statistical difference from the geraniol group. [ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ )].

In recovering fish exposed to GRL, the records showed differences in tracings relative to the induction group (Fig. 7), with a gradual increase in HR ( $97 \pm 4$  beats  $\text{min}^{-1}$ ) and amplitude ( $1.04 \pm 0.05$  mV) (Fig. 6A and B), showing no statistical differences against the controls. On the other hand, animals exposed to CTL (Fig. 5B) presented a slow recovery. HR was relatively low ( $81 \pm 4$  beats  $\text{min}^{-1}$ ), and amplitude of  $0.38 \pm 0.05$  mV was lower ( $p < 0.05$ ) relative to the other groups (Fig. 6A e B), showing a yet lingering anaesthetic effect in recovery.

The R-R interval during recovery in GRL-exposed fish showed a gradual return to the initial condition ( $0.56 \pm 0.05$  s), with a Q-T interval of  $0.28 \pm 0.03$  s and a QRS duration of  $0.04 \pm 0.00$  s. No significant differences occurred between the controls (Fig. 10A and B). On the other hand, animals exposed to CTL showed higher averages in the R-R ( $0.73 \pm 0.09$  s) and Q-T ( $0.32 \pm 0.04$  s) intervals, with a QRS of  $0.04 \pm 0.00$  s, being the higher ( $p < 0.05$ ) in relation to all groups (controls and GRL) (Fig. 6C, D and E).

#### 4. DISCUSSION

The ECG profile is relevant for the evaluation of the effects regarding several substances used in aquatic animals (Vanegas et al., 2016; Barbas et al., 2017a; Xing et al., 2017; Song et al., 2018; Yonekura et al., 2018; De Souza et al., 2019). Cardiac responses are modulated by external agents to which fish are exposed. ECG records allow for the assessment of cardiac alterations that may indicate tissue damage or acute cardiotoxicity, including possible longterm impacts to the heart function (Vornanen, 2017; Xing et al., 2017; Cantanhêde et al., 2020).

While the heart maintained its sinus rhythm in the controls, GRL and CTL did modulate cardiac responses in tambaqui. Fish exposed to GRL had reduced HR and mean amplitude compared to the controls, which indicates a negative chronotropic effect, despite not presenting marked cardiac depression. Similar to our findings, other studies found reductions in the HR and progressive resumption thereof during recovery of tambaqui exposed to citronella and *Nepeta cataria* EO and menthol (Barbas et al., 2017a; De Souza et al., 2019; Cantanhêde et al., 2020).

Heart rate is determined by the pacemaker activity rate. The electrical impulses that generate the sinus rhythm in fish are determined by specialized pacemaker tissue cells located

1 in the sinoatrial node and exerted by action potentials upon which Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions are  
2 involved (Farrell and Jones, 1992; Hassinen et al., 2017; Rantin et al., 2020).

3 The inhibition of contractions mediated by the activation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>  
4 channels has already been described for the GRL in vitro and *in vivo* studies. It caused a  
5 vasorelaxant effect, in addition to promoting negative chronotropic and inotropic effects after  
6 direct blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels (De Menezes-Filho et al., 2014). However, the  
7 relationship of Ca<sup>2+</sup> influx on myocardial contractility of fish is still poorly understood  
8 (Driedzic and Gesser, 1994). This negative chronotropism was also observed in our results for  
9 the animals submitted to anaesthesia with GRL.

10 Similar to the controls, fish exposed to GRL showed rather rhythmic recordings, with  
11 R-R interval without much variation (low SD), and despite the prolongation of the Q-T interval,  
12 the substance did not affect the QRS complex. These results were similar to those described for  
13 this substance in studies that evaluated the contractile and electrophysiological properties of  
14 GRL in isolated hearts (De Menezes-Filho et al., 2014).

15 The greatest alterations in tracings were observed in CTL-exposed fish, which showed  
16 longer cardiac cycle with bradycardia. As proposed in previous studies, it could be a result of  
17 the CNS depression or a direct consequence of the depressant effect of this substance on the  
18 cardiac and respiratory tissues (De Souza et al., 2019). The HR dropped sharply, presenting  
19 quite reduced power, indicated by the decreased amplitude of the R wave, showing a negative  
20 CTL-related chronotropic effect. Clinical studies have suggested that the reduced amplitude of  
21 the R wave may be a predictor of myocardial infarction (Sun et al., 2013).

22 The prolongation of the Q-T and R-R intervals occurred and was a similar condition  
23 to that described by Cantanhêde et al. (2021) in a study using different dosages of menthol as  
24 an anaesthetic for tambaqui. Such a prolongation was ascribed to a bradycardic condition. In  
25 fact, this condition is related to these intervals, as they are associated with HR (Ahnve and  
26 Vallin, 1982; Browne et al., 1982; Vornanen, 2017; Rantin et al., 2020). Studies using zebrafish  
27 suggested that Q-T prolongation is associated with arrhythmia (Xing et al., 2017; Lin et al.,  
28 2018), a condition also evidenced in fish exposed to CTL. Prolongation of this interval usually  
29 indicates delayed ventricular repolarization (Fermini and Fossa, 2003; Xing et al., 2017), since  
30 the duration of the Q-T interval indicates the ventricular cycle, where Q marks the beginning  
31 of the depolarization and T the ventricular myocardial repolarization process (Cotter and  
32 Rodnick, 2006; Mcgrath and Li, 2008).

1           The changes in the R-R interval with absence of the QRS complex in animals exposed  
2 to CTL found herein, suggest arrhythmia and therefore a potential for atrioventricular blockade.  
3 Tracing patterns between P waves, showed cardiac activity without sinus rhythm and with a  
4 longer ventricular cycle. However, during washout when fish were transferred to anaesthetic  
5 free water, this condition was rather rapidly reversed within five minutes.

6           These ECG changes probably occurred as a result of the indirect effect on the  
7 ventricular conduction by the partial blockade of voltage gated-dependent Na<sup>+</sup> channels  
8 induced by CTL, since these channels are responsible for the rapid depolarization of the  
9 membrane. In addition, this blockade can promote a delayed intracardiac conduction,  
10 prolonging the QRS complex, as they decrease the availability of channels for depolarization  
11 (Keating and Sanguinetti, 2001; De Sousa et al., 2006; Delk et al., 2007; Harmer et al., 2011).  
12 It was corroborated by our results, where fish exposed to CTL showed a prolongation during  
13 the ventricular contraction process that corresponds to the QRS complex, indicating a negative  
14 chronotropism effect, *i.e.*, this group took longer to depolarize, showing weaker contraction  
15 power.

16           QRS complex prolongation represents changes in action potentials and depolarization  
17 time in all ventricular myocytes, as the influx of Na<sup>+</sup> promotes a gradual increase in  
18 depolarization. Fish exposed to CTL showed similar responses to those reported for two  
19 neotropical freshwater fish species (*Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*) previously  
20 exposed to mercury (Hg) and subjected to hypoxia in which prolongations of the R-R and Q-T  
21 intervals and duration of the QRS complex were described (Monteiro et al., 2020), with  
22 atrioventricular blockade and arrhythmia.

23           Although GRL and CTL induced reversible body immobilisation and distinct  
24 electrophysiological features in fish, which were compatible with anaesthesia (Araújo et al.,  
25 2021), electrocardiographic characterization should be systematically used so as to rule out the  
26 possibility of deleterious implications that might be involved throughout or after the exposure  
27 to a given compound in anaesthetic baths. Future studies focusing on mechanistic aspects of  
28 the induction with both compounds, *e.g.* recordings of intracellular action potentials and  
29 sarcolemma ion currents, could shed more light on the cardiac safety and suitability of these  
30 isolates to be broadly recommended and used as fish anaesthetics.

31           In summary, both anaesthetics elicited cardiac effects without compromising recovery.  
32 However, GRL showed some advantages over CTL as it reduced heart rate without profoundly  
33 changing the duration of the R-R, Q-T intervals or the amplitude and duration of the QRS

complex. In addition, the GRL allowed for the maintenance of the sinus rhythm. On the other hand, CTL induced bradycardia and arrhythmia with an indication for potential atrioventricular blockade, prolonging the duration of the QRS complex and the R-R and Q-T intervals after exposure. Notwithstanding, results of this study showed that both compounds allowed for a fast effect reversibility during recovery in clean water. Overall, such findings lend more credence to the use of these substances as fish anaesthetics, mainly in the case of geraniol.

## Disclosures

Authors have no conflict of interest to declare.

## Acknowledgements

E.R.L.A is grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Brazilian CAPES) for the scholarship provided. Authors are also thankful to students and staffs of the Tropical Species Aquaculture Laboratory (LAET/IFPA – Castanhal) and Natural Products Toxicology Laboratory (UFPA – Belém) for their technical assistance during the experiments. L.A.S is a research fellow of the National Council for Scientific and Technological Development (Brazilian CNPq).

## REFERENCES

- Ahnve, S., Vallin, H., 1982. Influence of heart rate and inhibition of autonomic tone on the QT interval. *Circulation* 65, 435–439. <https://doi.org/10.1161/01.cir.65.3.435>.
- Araújo, E.R.L., Silva, J.S., Lopes, L.M., Torres, M.F., Alho da Costa, B.M.P., Amarante, C.B., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., Sampaio, L.A., 2021. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture* 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>.
- Aydın, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>.
- Baldisserotto, B., Barata, L.E.S., Silva, A.S., Lobato, W.F.F., Silva, L.L., Toni, C., Silva, L.V.F., 2018. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. *Neotropical Ichthyology* 16, 170128. DOI: 10.1590/1982-0224-20170128
- Barbas, L.A.L., Stringhetti, G.R., Garcia, L.O., Figueiredo, M.R.C., Sampaio, L.A., 2016. Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. *Aquaculture*, 456, 70–75.

- 1 Barbas, L.A.L., Hamoy, M., De Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., De Lima, H.D.S.T., Torres, M.F.,  
2 Do Nascimento, L.A.S., Da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017a.  
3 Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma*  
4 *macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*. 479, 60 – 68.
- 5 Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., de Garcia, L.O., Monserrat, J.M., da Silva,  
6 D.T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2017b. Properties of two plant extractives as  
7 anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*  
8 469, 79–87.
- 9 Barbas, L.A.L., Torres, M.F., da Costa, B.M.P.A., Feitosa, M.J.M., Maltez, L.C., Amado, L.L.,  
10 Toda, Y.P.S., Batista, P.S., Cabral, D.A.C., Hamoy, M., 2021. Eugenol induces body  
11 immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term  
12 baths. *Aquat. Toxicol.* 231, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105734>.
- 13 Bastos, J.F., Moreira, I.J., Ribeiro, T.P., Medeiros, I.A., Antonioli, A.R., De Sousa, D.P.,  
14 Santos, M.R., 2009. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene  
15 alcohol, in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106, 331-337.
- 16 Browne, K.F., Zipes, D.P., Heger, J.J., Prystowsky, E.N., 1982. Influence of the autonomic  
17 nervous system on the Q-T interval in man. *Am. J. Cardiol.* 50, 1099–1103.
- 18 Cantanhêde, S.M., Hamoy, M., Montag, L.F.A., Amado, L.L., 2020. Electrophysiological  
19 responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes:  
20 Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol.*  
21 *Pharmacol.* 228, 108653. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>.
- 22 Cantanhêde, S.M., Amado, L.L., Costa, B.M.P.A., Barbas, L.A.L., Torres, M.F., Hamoy, A.O.,  
23 Paz, C.A., Ferreira, S.B.S., Lima, G.O., Sousa, J.R., Almeida, L.C.N., Bentes, N.H.M.,  
24 Mello, V.J., Hamoy, M., 2021. Menthol exposure induces reversible cardiac depression and  
25 reduces lipid peroxidation in the heart tissue of tambaqui *Colossoma macropomum*.  
26 *Aquaculture* 541, 736847. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736847>
- 27 Castro, H.G., Perini, V.B.M., Santos, G.R., Leal, T.C.A.B., 2010. Evaluation of content and  
28 composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. *Rev.*  
29 *Ciênc. Agron.* 41, 308–314.
- 30 Cotter, P.A., Rodnick, K.J., 2006. Differential effects of anaesthetics on electrical properties of  
31 the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 145, 158–165.  
32 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.001>.
- 33 De Menezes-Filho, J.E.R., Gondim, A.N.S., Cruz, J.S., De Souza, A.A., Santos, J.N.A., Conde-  
34 Garcia, E. A., Sousa, D.P., Santos, M.S., Oliveira, E.D., Vasconcelos, C. M. L., 2014.  
35 Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful  
36 effects to treat arrhythmias. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(6), 534–  
37 544.
- 38 De Oliveira, C.P.B., da Paixão Lemos, C.H., Vidal, L.V.O., Couto, R.D., Pereira, D.S.P.,  
39 Copatti, C.E., 2019. Anaesthesia with eugenol in hybrid Amazon catfish (*Pseudoplatystoma*  
40 *reticulatum* × *Leiarius marmoratus*) handling: Biochemical and haematological responses.  
41 *Aquaculture* 501, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.046>.
- 42 De Sousa, D.P., Gonçalves, J.C.R., Quintans-Júnior, L., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., Almeida,  
43 R.N., 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents.  
44 *Neurosci Lett* 401, 231–5.
- 45 De Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., De Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L.,  
46 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked  
47 myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory  
48 responses. *Aquaculture* 500, 160–169.
- 49 Delk C., Holstege C.P., Brady W.J., 2007. Electrocardiographic abnormalities associated with  
50 poisoning. *Am J Emerg Med* 25, 672–687.

- 1 Driedzic, W.R., Gesser, H., 1985.  $\text{Ca}^{2+}$  protection from the negative inotropic effect of  
2 contraction frequency on teleost hearts. J. Comp. Physiol. Part B-Biochem.156, 135–142.  
3 <https://doi.org/10.1007/bf00692936>.
- 4 Façanha, M.F., Gomes, L.D.C., 2005. A eficácia do mentol como anestésico paratambaqui  
5 (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). Acta Amaz 35, 71–75.  
6 <https://doi.org/10.1590/s0044-59672005000100011>.
- 7 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2020. The State of World  
8 Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>.
- 9 Farrell, A.P., Jones, D.R., 1992. The heart. In *Fish Physiology*, vol. XIIA (ed. W. S. Hoar, D.  
10 J. Randall and A. P. Farrell), Academic Press. pp. 1-88.
- 11 Fermini, B., Fossa, A.A., 2003. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug  
12 discovery and development. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 439-447.  
13 <https://doi.org/10.1038/nrd1108>.
- 14 Fujimoto, R.Y., Pereira, D.M., Silva, J.C., Oliveira, L.C.A.O., Inoue, L.A.K.A., Hamoy, M.,  
15 Mello, V.J., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2017. Clove oil induces anaesthesia and blunts  
16 muscle contraction power in three Amazon fish species. Fish Physiol Biochem, 44, 245–  
17 256.
- 18 Harmer, A.R., Valentin, J.P., Pollard, C.E., 2011. On the relationship between block of the  
19 cardiac  $\text{Na}^+$  channel and drug-induced prolongation of the QRS complex. Br. J. Clin.  
20 Pharmacol. 164, 260–273. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01415.x>.
- 21 Hassinen, M., Haverinen, J., Vornanen, M., 2017. Small functional  $\text{I}_{\text{f}}$  current in sinoatrial  
22 pacemaker cells of the brown trout (*Salmo trutta fario*) heart despite strong expression of  
23 HCN channel transcripts. Am J Physiol 313: R711–R722.  
24 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00227.2017>.
- 25 Inoue, L.A.K.A., Neto, C. do S., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of  
26 matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). Ciência Rural 33, 943–947.  
27 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>.
- 28 Inoue L.A.K.A., Boijink C.L., Ribeiro P.T., Silva A.M.D., Affonso E.G., 2011. Avaliação de  
29 respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. Acta Amaz.  
30 41, 327-32.
- 31 Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., 2006.  
32 Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. J Agric Food  
33 Chem. 54, 6303–6307. <https://doi.org/10.1021/jf060608c>.
- 34 Keating, M.T., Sanguinetti, M.C., 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac  
35 arrhythmias. Cell 104, 569-580. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00243-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00243-4).
- 36 Lin, M.H., Chou, H.C., Chen, Y.F., Liu, W., Lee, C.C., Liu, L.Y.M., Chuang, Y.J., 2018.  
37 Development of a rapid and economic in vivo electrocardiogram platform for cardiovascular  
38 drug assay and electrophysiology research in adult zebrafish. Sci Rep 8:15986.
- 39 Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A., Simões, M., 2015. Antibacterial effects  
40 and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia*  
41 *coli* and *Staphylococcus aureus*. Evid Based Complement Alternat Med.; v.2015:9p.
- 42 McGrath, P., Li, C.Q., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity.  
43 Drug discovery today. 13, 394-401. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.03.002.
- 44 Menezes-Filho, J.E.R, Gondim, A.N.S., Cruz, J.S., Souza, A.A., Santos, J.N.A., Conde-  
45 Garcia, N.A., Sousa, D.P., Santos, M.S., Oliveira, E.D., Vasconcelos, C.M.L., 2014.  
46 Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful  
47 effects to treat arrhythmias. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 115, 534-544.  
48 <https://doi.org/10.1111/bcpt.12274>.

- Monteiro, D.A., Taylor, E.W., McKenzie, D.J., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2020. Interactive effects of mercury exposure and hypoxia on ECG patterns in two Neotropical freshwater fish species: Matrinxã, *Brycon amazonicus* and traíra, *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology*.
- Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*: 246, 467-481.
- Pádua S.B., Dias Neto J., Sakabe R., Claudiano G.S., Chagas E.C., Pilarski F., 2013. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. *Pesqui Agropec Bras.* 48, 1171-74.
- Quintans-Júnior, L.J., Souza, T.T., Leite, B.S., Lessa, N.M.N., Bonjardim, L.R., Santos, M.R.V., et al., 2008. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* 15, 619–24.
- Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Monteiro, D.A., 2020. The cardiovascular system. In: Baldisserotto B, Urbinati EC, Cyrino JEP (eds) *Biology and physiology of freshwater neotropical fish*, 1st edn. Academic Press, 185–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.09995-4>.
- 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.
- Saccol, E.M.H., Toni C., Pês, T., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Silva, L.V.F, Mourão, R.H.V., Oliveira, R.B., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2016. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research* 48, 2012-2031.
- Santos Batista, E., Brandão, F.R, Majolo, C., Inoue, L.A.K.A., Maciel, P.O., De Oliveira, M.R., Chaves, F.C.M., Chagas, E.C., 2018. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. *Aquaculture* 495, 545–549. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.040>.
- 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. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337>.
- Song, J., Qiao, L., Ji, L., Ren, B., Hu, Y., Zhao, R., Ren, Z., 2018. Toxic responses of zebrafish (*Danio rerio*) to thallium and deltamethrin characterized in the electrocardiogram. *Chemosphere* 212, 1085 - 109 4. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.014>.
- Sun, X., Cai, J., Fan, X., Han, P., Xie, Y., Chen, J., Xiao, Y., Kang, Y.J., 2013. Decreases in electrocardiographic R-wave amplitude and QT interval predict myocardial ischemic infarction in rhesus monkeys with left anterior descending artery ligation. *Plos One.* 8, 71876. DOI: 10.1371/journal.pone.007187 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071876>.
- Unesco, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. France, Paris.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 10, 351-369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., Cavali, R.O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports* 19, 100611. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513421000272>.
- Vanegas, G., Lancien, F., Leprince, J., Vaudry, H., Le Mével, J-C., 2016. Effects of peripherally administered urotensin II and arginine vasotocin on the QT interval of the electrocardiogram in trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 183–184, 53–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.01.006>.
- Vilhena, C.S., Nascimento, L.A.S., Andrade, E.H.A., Silva, J.K.R., Hamoy, M., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like

- state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 510, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.057>.
- Vornanen M., 2017 .Electrical excitability of the fish heart and its autonomic regulation. *Fish Physiol* 36, 99–153. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.04.002>.
- Wang, W., Dong, H., Sun, Y., Cao, M., Duan, Y., Li, H., Liu, Q., Gu, Q., Zhang, J., The efficacy of eugenol and tricaine methanesulphonate as anaesthetics for juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) during simulated transport. *J Appl Ichthyol.* 35, 551-557. <https://doi.org/10.1111/jai.13844>.
- Xing, N., Ji, L., Song, J., Ma, J., Li, S., Ren, Z., Xu, F., Zhu, J. 2017. Cadmium stress assessment based on the electrocardiogram characteristics of zebrafish (*Danio rerio*): QRS complex could play an important role. *Aquatic Toxicol* 191, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.015>.
- Yonekura M., Kondoh, N., Han, C., Toyama, Y., Ohba, T. Ono, K., Itagaki, S., Tomita, H., Murakami, M., 2018. Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil. *J Pharm Sci.* 137, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.04.003>.
- Yoshikawa, H., Ishida, Y., Yokoyama, Y., Ueno, S., Mitsuda, H., 1988. Electrocardiograms in five bipolar leads recorded from the body surface of three fish species (*Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus* and *Pagrus major*) in fresh or sea-water. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Physiol.* 91, 759-764. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(88\)90961-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(88)90961-9).
- Zahl, I.H., Samuelson, O., Kiessling, A., 2012. Anaesthesia of farmed fish: Implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 201–218. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9565-1>.

### CAPÍTULO 3

#### **Electroencephalographic characterization in juvenile Tambaqui, *Colossoma macropomum* exposed to short-term baths with geraniol and citronellol**

Ednara Ronise L. de Araújo<sup>a</sup>, Marcelo Ferreira Torres<sup>b</sup>, Brenda M. P. Alho da Costa<sup>b</sup>, Moisés Hamoy<sup>d,\*</sup>, Luís André Sampaio<sup>a,\*\*</sup>, Luis André L. Barbas<sup>b,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Rio Grande – RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal – PA, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brazil

Corresponding authors at:

\* Correspondence to: M. Hamoy, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará, UFPA Campus Belém, Rua Augusto Corrêa nº 01 Guamá, CEP 66075–110 Belém, PA, Brazil.

\*\* Correspondence to: L. A. Sampaio, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Instituto de Oceanografia, CP 474, CEP 96201–900 Rio Grande, RS, Brazil.

\*\*\* Correspondence to: L. A. L. Barbas, Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, IFPA Campus Castanhal, BR 316, Km 63 S/N, CEP 68740–970 Castanhal, PA, Brazil.

E-mail addresses: hamoyufpa@gmail.com (M. Hamoy), sampaio@mikrus.com.br (L.A. Sampaio), andre.barbas@hotmail.com (L.A.L. Barbas).

Short note a ser submetida à revista *Aquaculture* (em preparação para submissão)

**Fator de Impacto: 5.135**

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate the level of neuronal depression in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum* exposed to geraniol (GRL) and citronellol (CTL) in immersion baths. A total of 54 juveniles weighing  $35.2 \pm 9.4\text{g}$  were used, essayed into 6 experimental groups: I – Basal control: clean water; II – Ethanol: water containing the highest volume of ethanol used in the anaesthetic dilution; III – GRL Induction –  $70 \mu\text{L L}^{-1}$ ; IV – CTL Induction –  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ ; V – GRL Recovery; and VI – CTL Recovery. Electroencephalographic recordings were performed for 300 seconds for each group. The results of the basal and ethanol control groups showed regular and similar activity. Upon contact with the anaesthetics, irregularities were observed in the tracings showing neuronal excitability and increased amplitudes, mainly on the case of CTL. Mostly, the GRL-exposed fish had regular tracings throughout induction, showing gradual recovery and stable tracings, consistent with an adequate anaesthetic effect. On the other hand, fish exposed to CTL showed altered EEG activity during induction, incompatible with an appropriate anaesthetic induction and smooth recovery, presenting high and irregular EEG amplitudes.

**Key words: EEG; monoterpenes; anaesthetic; sedation; fish welfare.**

## 1. INTRODUCTION

Several studies have evaluated anaesthetics for use in aquatic animals, however, only a few have used electrophysiological markers to corroborate the neuronal effects of these substances on the fish brain. Recent studies have evaluated fish anaesthesia from a combined brain and behavioural perspective throughout and after the exposure to gauge the extent of neuronal depression attained (Barbas et al., 2021; Costa et al., 2022).

In a study carried out using juvenile tambaqui, it was evaluated the behavioural changes induced by eugenol, which is considered a suitable anaesthetic for fish and widely used in aquaculture. However, an intense eugenol-related neuronal excitability, resembling a convulsive event was described, without depression of the central nervous system (CNS) activity in the short term, which was corroborated by the electroencephalographic EEG patterns recorded (Barbas et al., 2021). Hence, it was suggested that eugenol, which has been a traditional natural product for fish anaesthesia worldwide, might not be a suitable product for short-term anaesthetic induction of fish, as it could imply important concerns in terms of fish

welfare. Therefore, alternative products should be prospected to be recommended based on their suitability, also from a neuronal perspective.

Chemicals such as quinaldine sulfate, benzocaine and tricaine methanesulfonate (MS-222) have long been the most used anesthetics for fish, despite reports of some causing undesirable effects such as irritability, mucus loss, corneal damage and, contradictorily, promote stress (Svoboda and Kolavara, 1999; Inoue et al., 2003; Ross and Ross, 2008; Heo and Shin, 2010; Pawar et al., 2011), with metabolic changes and, consequently, affecting performance of the fish.

In this context, the use of natural products in sedative or anaesthetic doses has increased in an attempt to reduce the stress levels in fish farming, while ensuring increased survival, productivity, welfare and complying with ethics-related issues (Sneddon, 2012; Aydin and Barbas, 2020). The phytochemicals geraniol and citronellal are the main monoterpene compounds within the citronella grass, *Cymbopogon nardus* (Castro et al., 2010), that have an already verified anaesthetic effect on fish (De Araújo et al., 2021).

It is worth noting that, despite the variety of studies in the search for new anaesthetics (Aydin and Barbas, 2020), the characterization of the CNS response and possible deleterious effects on the brain function are still poorly elucidated for fish (Zahl et al., 2012). To overcome this limitation, electrophysiological analyses can be used to contribute to the validity and objectivity of the general anaesthesia evaluation in fish, as the monitoring of anaesthesia should include appropriate and selected parameters (Barbas et al., 2021; De Araújo et al., 2021).

Several studies on the anaesthesia of juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, have already been reported. This fish species shows resistance to handling and high sensitivity to substance testing. It has been considered a promising experimental model in electrophysiological studies according to recent studies (Barbas et al., 2017; De Souza et al., 2019; Vilhena et al., 2019; De Araújo et al., 2021; Barbas, et al., 2021; Cantanhede et al., 2021; Costa et al., 2022).

Thus, the objective of this study was to evaluate the level of neuronal depression in juveniles of tambaqui, *C. macropomum* exposed to short-term immersion baths with geraniol and citronellol.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 *Experimental Animals*

Juveniles of tambaqui, *Colossoma macropomum*, weighing  $35.2 \pm 9.4\text{g}$  acquired from a commercial farm were used. Initially, the animals were acclimated for 7 days in aquariums with a capacity of 300L in the Experimental Vivarium of the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products at the Universidade Federal do Pará (UFPA). The animals were kept in an environment with constant aeration and photoperiod of 12h C: 12h E. Feeding was performed twice a day with commercial feed (32% CP) until satiety. Daily cleaning was performed with partial water change (approximately 20% of the tank volume) to remove uneaten feed and faeces. The water quality variables were monitored daily and maintained as follows: Temperature  $26.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pH 7.5; DO  $> 5.0\text{ mg L}^{-1}$ ; ammonia  $0.1\text{ mg L}^{-1}$ .

### 2.2 *Experimental Design*

The animals were randomly essayed in 6 groups, as follows: a) Basal Control: in substance-free aquarium water; b) Ethanol Control: in aquarium water containing the highest equivalent volume of ethanol used in the anaesthetic dilution; c) Geraniol Induction (GRL): immersion bath in aquarium water containing  $70\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$  GRL; d) Citronellol Induction (CTL): immersion bath in aquarium water containing  $90\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$  CTL; e) Geraniol recovery; f) Citronellol Recovery. Nine fish were used for each group ( $n=9$ ), with each animal considered a replica and used only once. Analyses of electroencephalographic recordings were performed for 300 seconds during induction and recovery.

To evaluate the CNS activity of tambaqui, the power spectral density was evaluated for a period of 5 minutes and, separately, the last 30 seconds of recording of the induction period during contact with geraniol (GRL – 30 s) e citronellol (CTL – 30 s).

### 2.3 *Implantation of electrodes and acquisition of electroencephalographic recordings*

For the EEG recording procedures the methodologies of Hamoy et al. (2018) and Barbas et al. (2021) were used. After the implantation of the EEG electrodes, fish were transferred to the maintenance tanks for recovery, where they remained for 48 hours before the recordings. Upon recordings, fish were taken according to their respective treatment and restrained in a slotted foam pad, inside the aquarium, then the electrodes were connected to the fish midbrain and a high impedance amplifier, for the measurement of the potential field of the

midbrain area. Recording for each animal took 300 s. For more details on the EEG recording procedures and setup refer to Barbas et al. (2021).

## 2.4 Signal analysis and statistics

For the analysis of the acquired signals, a tool was built using the Python programming language version 2.7. Numpy and Scipy libraries were used for math processing and Matplotlib library for the graphics. The graphical interface was developed using the PyQt4 library (Souza-Monteiro et al., 2015). Frequency spectrograms were calculated using a Hamming window of 256 points (256/1000s), and each frame was generated with an overlap of 128 points per window. For each frame, the power spectral distribution (PSD) was calculated using the Welch mean periodogram methodology. Frequency histograms were made with the signal PSD (with 1-Hz boxes).

Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were used to assess data normality and variance homogeneity, respectively. Comparisons of power values were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test. The GraphPad Prism<sup>®</sup> 8 software was used for the analyses. A p-value < 0.05 was considered statistically significant in all cases.

## 3. RESULTS

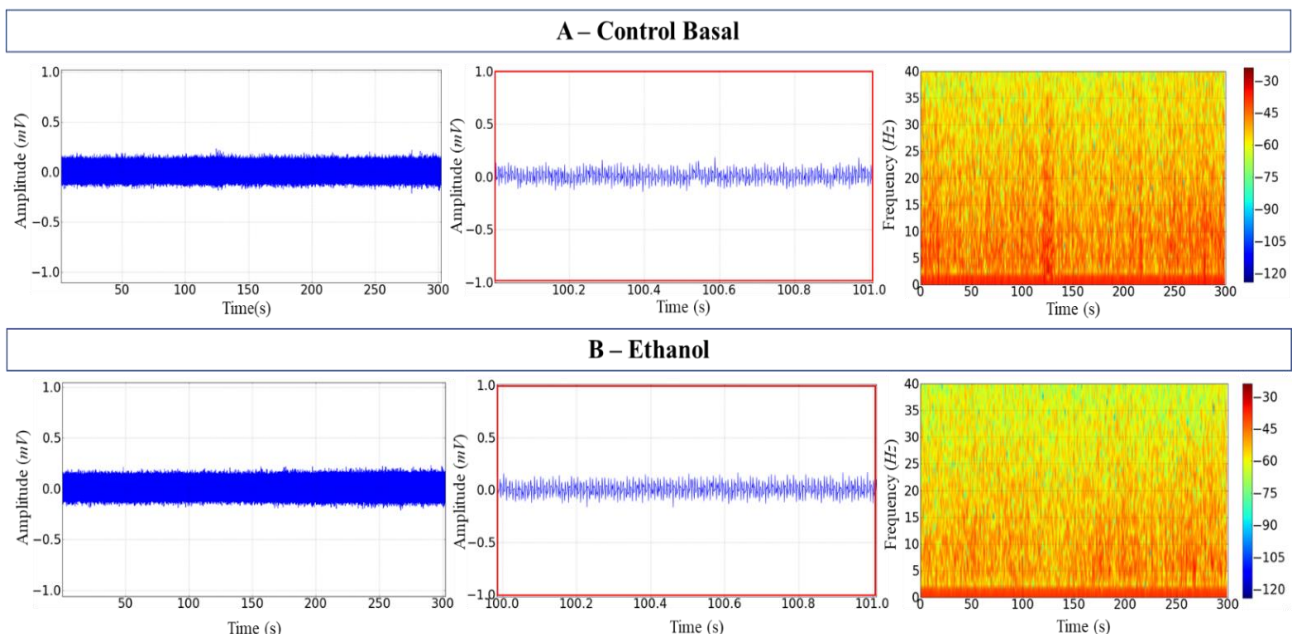


Figure 1. Tambaqui *C. macropomum* midbrain electroencephalographic (EEG) records. (A) Control basal records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B) Ethanol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.

There were no mortalities during or after the handling of the animals. The EEG recordings for the basal and ethanol control groups showed regular and similar activity, as can be seen in the amplification of the tracings, with low amplitudes with a mean amplitude of  $0.11 \pm 0.001$  mV. The spectrogram shows the distribution of power (intensity of the signal) in frequencies up to 40 Hz. Higher intensity was concentrated at frequencies below 5 Hz in both basal and ethanol controls (Fig. 1 A and B).

After the animals were exposed to the anaesthetics, irregularities were observed in the tracings with accentuated neuronal excitability, and an increased amplitude of the induction tracing. For the group submitted to the immersion bath with the GRL, the amplitude of the tracing reached  $0.23 \pm 0.001$  mV. Spectrogram of frequency showed a distribution of power between 20 – 25 Hz, which is maintained throughout the recording (Fig. 2 A).

For animals exposed to CTL, excitability also occurred during induction, with amplitude reaching  $0.37 \pm 0.002$  mV. In this group there was a greater irregularity in the tracings that were very evident (100 – 101s). The representative spectrogram, as well as for the GRL, showed energy variation during induction with CTL (Fig. 2 B).

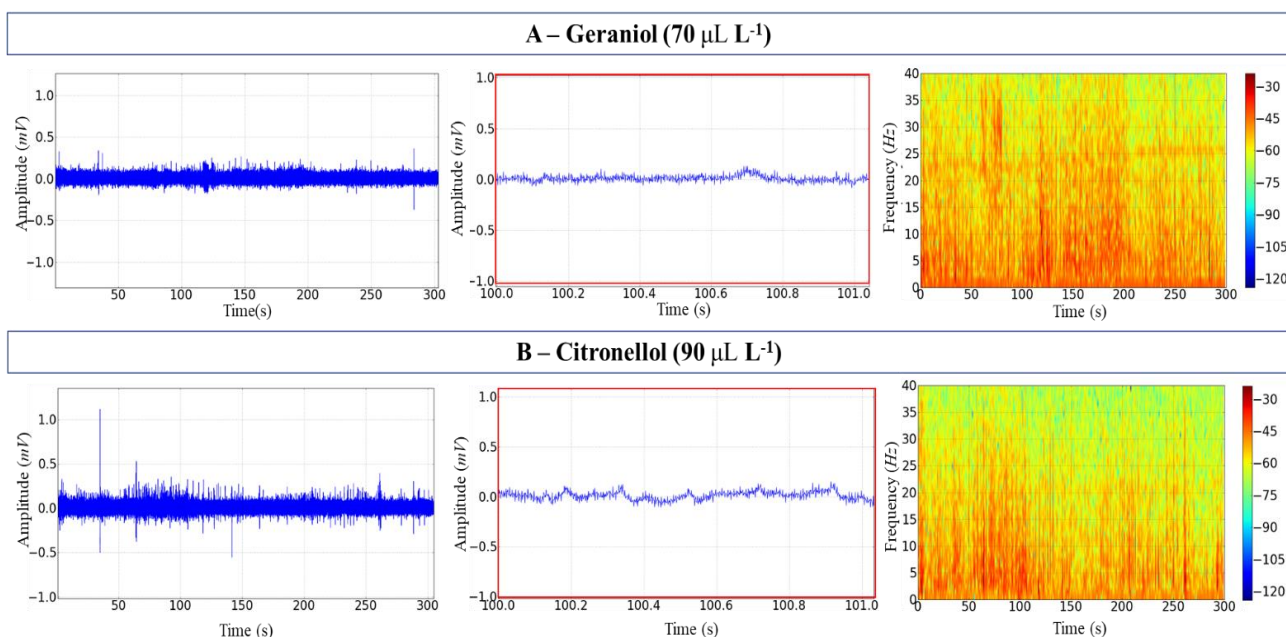


Figure 2. Electroencephalographic (EEG) recordings of the Tambaqui *C. macropomum* midbrain during induction. (A)  $\mu\text{L L}^{-1}$  Geraniol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B)  $90 \mu\text{L L}^{-1}$  Citronellol records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.

The recovery of fish exposed to GRL was gradual and showed to be stable in the tracings with amplitude reaching  $0.25 \pm 0.002$  mV. Amplification of the record and the spectrogram demonstrated a gradual increase in power at frequencies up to 40 Hz (Fig. 3 A).

On the other hand, during the 5 minute recovery of the animals exposed to CTL, the mean amplitude was  $0.37 \pm 0.001$  mV, and similarly to the induction, irregularities were observed in the tracings, evidenced by the amplification. The spectrogram demonstrated the power variation in frequencies up to 40 Hz, with a slight higher power between 25 – 30 Hz (Fig. 3 B).

Animals exposed to GRL and CTL showed higher power than the basal control, indicating excitability during contact with the substances. As for the total recording time, during recovery for both the GRL and CTL groups, excitability was also present, however, with amplitudes below the induced group. Yet, only the PSD of the GRL group resembled that of the baseline control in recovery (Fig. 4 A and B).

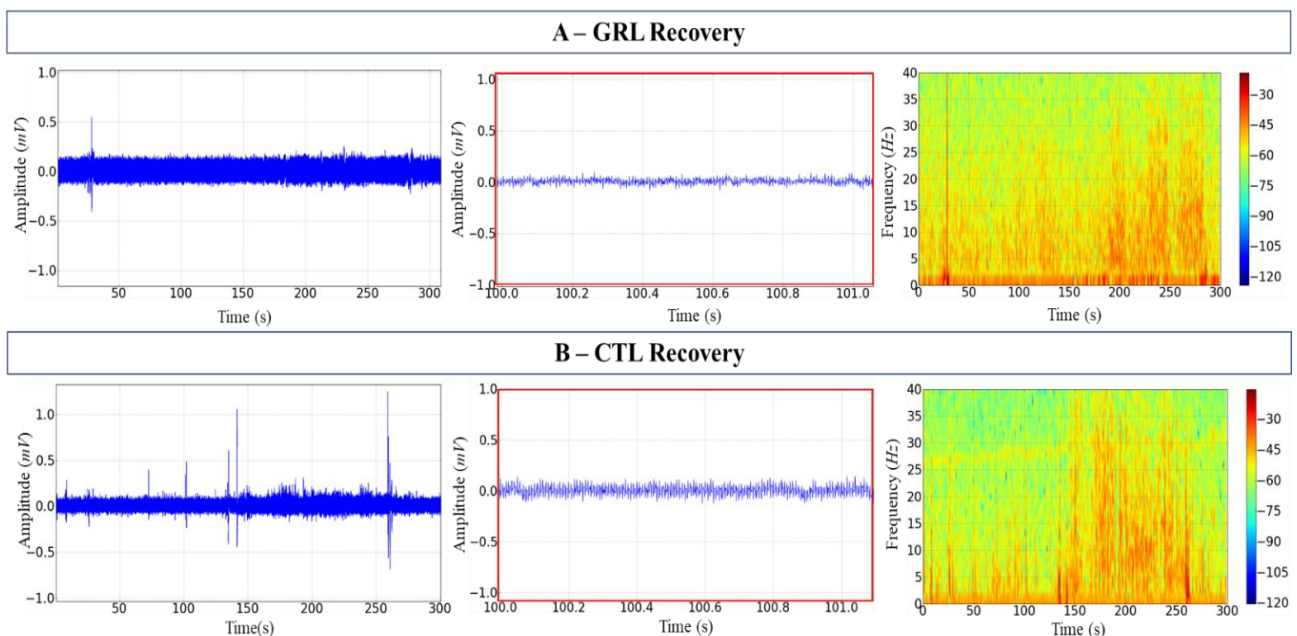


Figure 3. Electroencephalographic (EEG) recordings of the Tambaqui *C. macropomum* midbrain during recovery. (A) Geraniol (GRL) records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). (B) Citronellol (CTL) records over 300 s (left); 1-s snapshot amplification (centre), and the spectrogram of frequency showing the distribution of power (right). Amplification of 5000X.

The linear power distribution (Fig. 4 C) in the basal control and ethanol groups presented respective mean powers of  $0.0003 \pm 0.00003$  mV<sup>2</sup>/ Hz and  $0.0002 \pm 0.00003$  mV<sup>2</sup>/ Hz without significant differences. The mean power of the GRL group during the recordings of induction and recovery of animals exposed to anaesthetics was  $0.006 \pm 0.0001$  mV<sup>2</sup>/Hz, higher

( $p < 0.05$ ) from the other groups basal and ethanol and lower ( $p < 0.05$ ) from the CTL. The mean potency for the group exposed to CTL was much higher with a mean power of  $0.002 \pm 0.0003 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , being significantly higher ( $p < 0.05$ ) from the basal and ethanol controls.

The average power during the recovery of the GRL group was  $0.0005 \pm 0.00003 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , higher ( $p < 0.05$ ) from the groups basal and ethanol, and lower ( $p < 0.05$ ) from the CTL - induction and CTL - recovery). In the CTL group, the mean was  $0.001 \pm 0.0001 \text{ mV}^2/\text{Hz}$  much higher ( $p < 0.05$ ) from the basal and ethanol control groups, CTL - induction and GRL - induction.

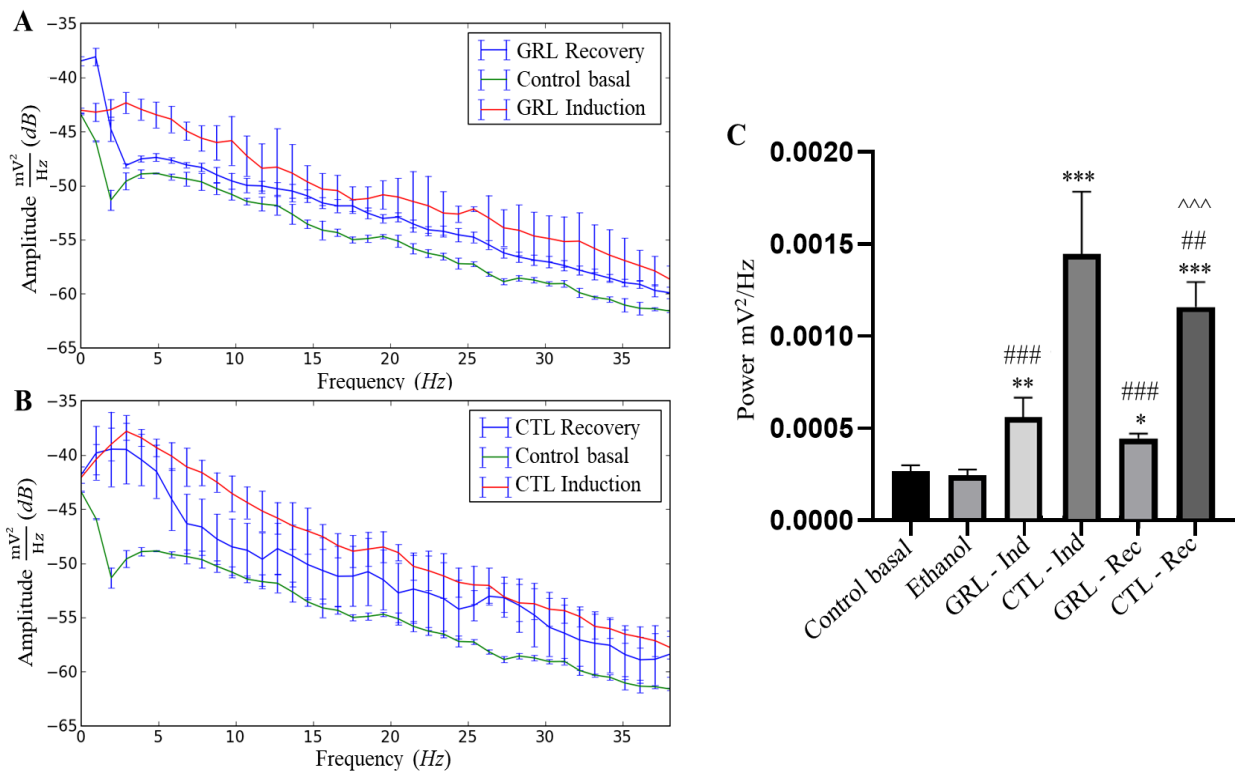


Figure 4. Power spectral density (PSD) of frequencies up to 40 Hz in Tambaqui *C. macropomum* compared with the power averages from the basal control, during geraniol induction (GRL –  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) and recovery compared with the power averages of the baseline control (A); and during citronellol induction (CTL –  $90 \mu\text{L L}^{-1}$ ) and recovery (B); Means of linear power between basal control, ethanol, geraniol induction (GRL – Ind), citronellol induction (CTL – Ind), geraniol recovery (GRL – Rec) and citronellol recovery (CTL – Rec) groups. \* indicates statistical differences from the control group; ^ indicates statistical differences from the GRL – Ind group; # indicates statistical differences from the CTL – Ind group; + indicates statistical differences from the CTL – Rec group. (After ANOVA followed by Tukey's test). (\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ ; (\*\*\*)  $P < 0.0001$ . (n=9).

In the PSD of the GRL group, we observed lower power during induction when analyzing the last 30 s of the recording. The frequencies from 6 to 24 Hz are below the basal control averages, indicating less signal capture by the electrode during the last 30 s of contact

with the anesthetic (Fig. 5A). In the CTL – 30 s group, the last 30 s of the recordings demonstrated greater power variation than in the basal group (Fig. 5 B).

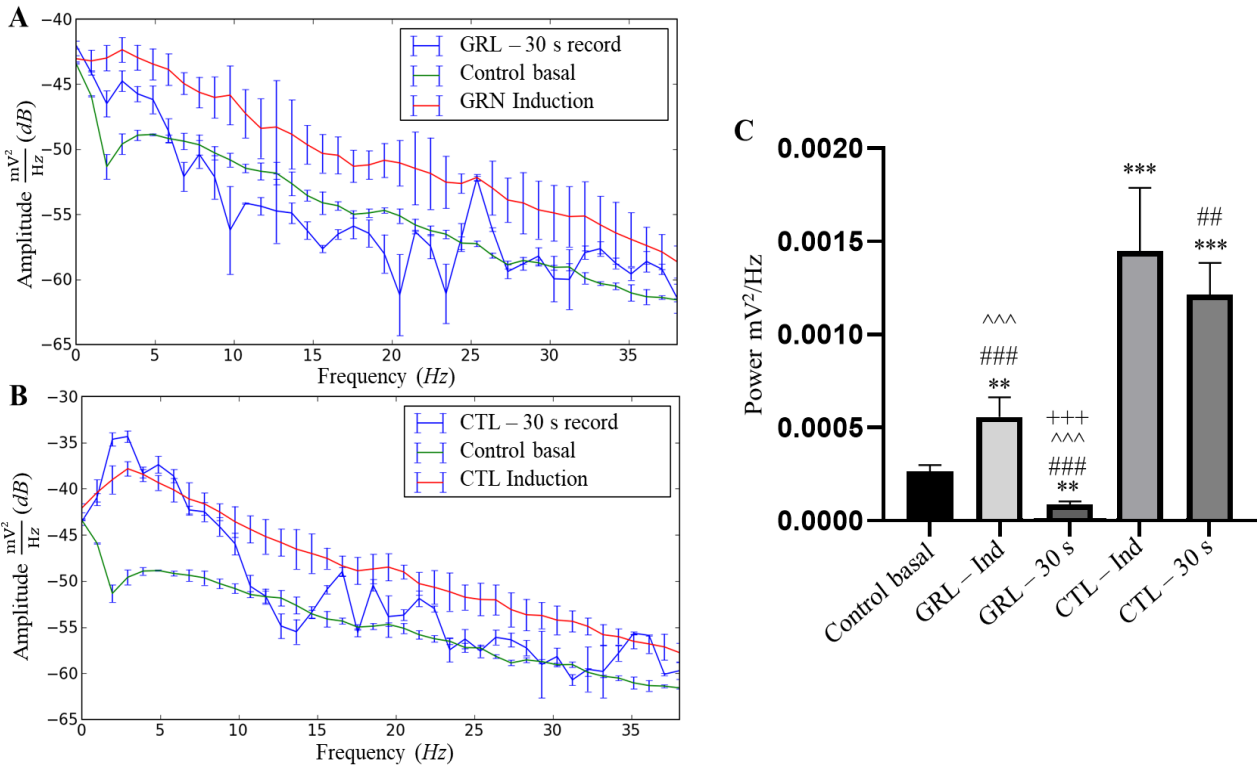


Figure 5. Power spectral density (PSD) of frequencies up to 40 Hz in Tambaqui *C. macropomum* compared for the last 30 seconds of the recordings (30 s), total time induction for geraniol (GRL – 70  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (A); and total time induction for citronellol (CTL – 90  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) (B); Means of linear power between groups of basal control, ethanol, geraniol induction (GRL – Ind), citronellol induction (CTL – Ind), geraniol recovery (GRL – Rec) and citronellol recovery (CTL – Rec) (C). \* indicates statistical differences from the control group; + indicates statistical differences from the GRL group; # indicates statistical differences from the CTL group; ^ indicates statistical difference for the CTL group – 30 s (C). (After ANOVA followed by Tukey). (\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ ; (\*\*\*)  $P < 0.0001$ , (n=9).

The linear distribution (Fig. 5 C) demonstrated the basal control group mean of  $0.0003 \pm 0.00003 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ . In the GRL group, the mean power was  $0.006 \pm 0.0001 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , higher ( $p < 0.05$ ) from the basal control group and lower ( $p < 0.05$ ) from CTL – induction and CTL – last 30s. During the last 30 s of induction for the GRL – 30 s, the tracings were more stable with a mean power of  $0.00008 \pm 0.00002 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , was lower ( $p < 0.05$ ) from the basal control, CTL – induction groups, CTL – last 30 s and GRL – induction. With tracings below the basal control group at frequencies 8 – 24 Hz. The CTL group, on the other hand, had an average power of  $0.001450 \pm 0.0003388 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ , differing from the other groups, as well as the CTL - 30 s ( $0.001216 \pm 0.0001703 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ ) with oscillations below the basal control, at frequencies 13 and 14 Hz and 28 at 31 Hz.

## 4. DISCUSSION

Monitoring the brain activity through EEG is essential for assessing the level of neuronal depression, as it will make it possible to attest if the drugs are acting at a central level (Chandroo et al., 2004; Medeiros et al., 2018; Barbas et al., 2021; Costa et al., 2022). Our results showed that the amplitudes of the EEG tracings observed in the basal control and ethanol groups were low and the frequency spectrogram indicated that energy intensity were predominant at frequencies below 5 Hz throughout the recording (Fig. 1 A and B). During neural signal processing, the analysis of the frequency spectrogram makes it possible to understand how the signal recorded by the EEG is composed, with its amplitude, intensity and frequency.

Furthermore, the spectrogram can serve to indirectly assess the nociceptive and anaesthesia component generated in response to external stimuli that may be harmful to fish, since many phytoconstituents have demonstrated action on the CNS, including sedative, antinociceptive and neuroprotective effects (De Sousa et al., 2006; Medeiros et al., 2018). Herein, fish exposed to GRL and CTL showed EEG tracing patterns of excitability. The analyzed PSD, during the final 30 s of induction, showed that the GRL group presented reduced power relative to the baseline, from 8 to 24 Hz (Fig. 5). It means that the EEG changes are well correlated with the anaesthetic effect of GRL, indicating that these frequencies are presumably related to an anaesthetic condition. This would be the first report in fish, since no studies of frequency bands were found in this animals.

The alterations presented in the CTL group with high mean amplitude of the tracings during the entire induction period, in the last ones and also during the recovery, at a physiological level, are inconsistent with the anesthetic standards.

Considering that EEG wave patterns have not been standardized for these animals yet, judging by the route of the anaesthetic administration, which differs from the other vertebrates, our results show the importance of the EEG in the evaluation of possible anesthetic candidates, since these substances are capable of promoting alterations in the tracings. As a rule, it is known that the GABA<sub>A</sub> receptor, the NMDA receptor and the voltage-gated channels (K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> and Na<sup>+</sup>) are the main targets of anaesthetics, being influenced in different ways (Alkire et al., 2008; Hall et al., 2004; Medeiros et al., 2018).

The effects of monoterpenes can occur by different mechanisms due to their structural diversity. GRL has already been shown to have hypnotic-sedative action in tests with rats

(Medeiros et al., 2018). The authors suggested that the mechanism of action of GRL may be through the allosteric modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor, as is the case of menthol, which is known to be a positive allosteric modulator of GABA<sub>A</sub> (Hall et al., 2004), these authors attributed to its structure and to the associated functional group (OH) this positive modulation of ion channels. Positive modulation of ligand-activated ion channels has a profound influence on neuronal activity, resulting in sedation and anaesthesia (Hall et al., 2004). This sedative effect of monoterpenes can be explained by the proven interaction of many of these with the GABA<sub>A</sub> receptor (Medeiros et al., 2018)

Although the CTL has already shown anticonvulsant and antinoceptive activity, since it is capable of inducing partial blockade of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and these channels are fundamental in regulating the excitability of neurons, and the blockade can facilitate the activation of the descending inhibitory pathway (De Sousa et al., 2006), our findings showed that this substance was not able to promote adequate anaesthetic effect when analyzing the electroencephalographic tracings.

Thus, we reinforce that due to the complexity in capturing neuronal signals and the different mechanisms of action of monoterpenes, these compounds can present different EEG responses, although they may induce loss of consciousness. In conclusion, both the GRL – 70 µl L<sup>-1</sup> and the CTL – 90 µl L<sup>-1</sup> were able to promote changes in the tracings, and the most consistent were determined by the GRL, therefore, presenting the expected effects for an anesthetic. While the CTL showed neuronal excitability during induction, with inconsistent patterns, not being recommended as an anesthetic.

## REFERENCES

- Alkire., M.T., Hudetz , G.A., Tononi, G., 2008. Consciousness and Anesthesia. *Science*. 322, 876-880. DOI: 10.1126/science.1149213.
- Aydın, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 1–9 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>.
- Barbas, L.A.L., Hamoy, M., De Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., De Lima, H.D.S.T., Torres, M.F., Do Nascimento, L.A.S., Da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*. 479, 60 – 68.
- Barbas, L.A.L., Torres, M.F., da Costa, B.M.P.A., Feitosa, M.J.M., Maltez, L.C., Amado, L.L., Toda, Y.P.S., Batista, P.S., Cabral, D.A.C., Hamoy, M., 2021. Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. *Aquat. Toxicol.* 231, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105734>.

- Cantanhêde, S.M., Hamoy, M., Montag, L.F.A., Amado, L.L., 2020. Electrophysiological responses in Amazonian fish species *Bryconops caudomaculatus* (Osteichthyes: Characiformes) as biomarkers of xenobiotic toxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 228, 108653. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108653>.
- Castro, H.G., Perini, V.B.M., Santos, G.R., Leal, T.C.A.B., 2010. Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. *Rev. Ciênc. Agron.* 41, 308–314.
- Chandroo, K. P.; Duncan, I. J. H.; Moccia, R. D., 2004. Can fish suffer?: Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, n. 3–4, p. 225–250.
- Costa, B.M.A., Torres, M.F., Silva, R.A., Aydın, B., Amado, L.L., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., 2022. Integrated behavioural, neurological, muscular and cardiorespiratory response in tambaqui, *Colossoma macropomum* anaesthetized with menthol. *Aquaculture*. 560, 738553. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738553>
- De Araújo, E.R.L., Silva, J.S., Lopes, L.M., Torres, M.F., Alho da Costa, B.M.P., Amarante, C.B., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., Sampaio, L.A., 2021. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture* 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>.
- De Sousa, D.P., Gonçalves, J.C.R., Quintans-Júnior, L., Cruz, J.S., Araújo, D.A.M., Almeida, R.N., 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 401, 231–5.
- De Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., De Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169.
- Hall, A.C., Turcotte, C.M., Betts, A.B., Yeung, W-Y., Agyeman, A.S., Burk, L.A., 2004. Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. *Eur J Pharmacol.* 506, 9-16. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.10.026
- Hamoy M., Dos Santos Batista L., de Mello V.J., Gomes-Leal W., Farias R.A.F., Dos Santos Batista P., do Nascimento J.L.M., Marcondes H.C., Taylor J.G., Hutchison W.D., Torres M.F., Barbas L.A.L. 2018. Cunaniol-elicited seizures: Behaviour characterization and electroencephalographic analyses. *Toxicol Appl Pharmacol.* 360, 193–200. DOI: 10.1016/j.taap.2018.10.008.
- Heo, G.J., Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia.* 37, 132–135. Doi:10.1111/j.1467-2995.2009.00510.x
- Inoue, L.A.K.A., Neto, C. do S., Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Ciência Rural* 33, 943–947. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>.
- Medeiros, K.A.A.L., Santos, J.R., Melo, T.C.S., Souza, M.F., Santos, L.G., Gois, A.M., Cintra, R.R., Lins, L.C.R.F., Ribeiro, A.M., Marchioro, M., 2018. Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats: Behavior and ECoG power spectra. Depressant effect of geraniol on the central nervous system of rats: Behavior and ECoG power spectra. 41, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.008>.
- Pawar, H.B., Sanaye, S.V., Sreepada, R.A., Harish, V., Suryavanshi, U., Tanu, Ansari, Z., 2011. Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture*, [s. l.], v. 311, n. 1– 4, p. 155–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.007>.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. (228 p).
- Sneddon, L.U., 2012. Clinical anesthesia and analgesia in fish. *J. Exot. Pet Med.* 21, 32–43.

- 1 Svoboda, M., Kolarova, J., 1999. A survey of anaesthetics used in the fish farming. Health  
2 Protection of Fish - Proceeding of Papers. Research Institute of Fish Culture and  
3 Hydrobiolo y odňany pp 49-72.
- 4 Vilhena, C.S., Nascimento, L.A.S., Andrade, E.H.A., Silva, J.K.R., Hamoy, M., Torres, M.F.,  
5 Barbas, L.A.L., 2019. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like  
6 state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*.  
7 Aquaculture, 510, 169-175.

## CAPÍTULO 4

### **Balanço oxidativo do tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte simulado com concentrações sedativas de geraniol e citrônolol**

Ednara Ronise L. de Araújo<sup>a</sup>, Marcelo Ferreira Torres<sup>b</sup>, Brenda M. P. Alho da Costa<sup>b</sup>, Moisés Hamoy<sup>d,\*</sup>, Luís André Sampaio<sup>a,\*\*</sup>, Luis André L. Barbas<sup>b,\*\*\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Rio Grande – RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal – PA, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, Brazil

Corresponding authors at:

\* Correspondence to: M. Hamoy, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Federal do Pará, UFPA Campus Belém, Rua Augusto Corrêa nº 01 Guamá, CEP 66075–110 Belém, PA, Brazil.

\*\* Correspondence to: L. A. Sampaio, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Instituto de Oceanografia, CP 474, CEP 96201–900 Rio Grande, RS, Brazil.

\*\*\* Correspondence to: L. A. L. Barbas, Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, IFPA Campus Castanhal, BR 316, Km 63 S/N, CEP 68740–970 Castanhal, PA, Brazil.

E-mail addresses: hamoyufpa@gmail.com (M. Hamoy), sampaio@mikrus.com.br (L.A. Sampaio), andre.barbas@hotmail.com (L.A.L. Barbas).

Manuscrito a ser submetido à revista **Fish Physiology and Biochemistry** (em preparação para submissão)

**Fator de Impacto: 3.014**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o balanço oxidativo de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte simulado em diferentes tempos (2, 6 e 10 horas) utilizando doses sedativas de Geraniol ( $0,20 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $0,18 \mu\text{L L}^{-1}$ ). Foram utilizados 360 juvenis ( $26,97 \pm 3,73 \text{ g}$  e  $11,93 \pm 0,44 \text{ cm}$ ) distribuídos em 12 tratamentos em triplicata na presença de Geraniol (GRL-02, GRL-06 e GRL-10) ou Citronelol (CTL-02, CTL-06 e CTL-10) e dois tratamentos controle, água livre de anestésico (CRT-02, CRT-06 e CRT-10) e veículo etanol (ETN-02, ETN-06 e ETN-10). Quando avaliada a capacidade antioxidante (ACAP) nos tecidos ao fim de cada tempo de transporte, as brânquias mostraram maior competência oxidante em relação aos demais tecidos analisados, embora os resultados mais significativos estejam relacionados aos níveis de P-SH e aumento na concentração da GSH no transporte com GRL e CTL para as brânquias. Por outro lado, o músculo foi o tecido com maiores níveis de peroxidação lipídica (LPO) nos animais transportados com CTL, independente da duração. Assim, o uso do GRL se mostrou uma boa opção como sedativo para o transporte de peixes, mitigando os danos oxidativos principalmente nas brânquias, por outro lado, o CTL demonstrou ação pró-oxidante, com altos níveis de LPO no músculo dos animais pós-transporte.

**Palavras chave: antioxidante, pró-oxidante, fitoconstituintes, sedação, anestésico.**

## 1. INTRODUÇÃO

O Transporte de peixes é uma prática corriqueira na produção aquícola, sendo potencialmente uma das mais estressantes, já que é influenciado por vários fatores que incluem desde o processo de captura, densidade de estocagem, variações de temperatura e alteração de outros parâmetros de qualidade da água, como o aumento de compostos nitrogenados e transições entre condição de hiperóxia e hipóxia na água de transporte (Gomes et al., 2003a,b; Iversen et al., 2005; Gomes et al., 2006; Iversen et al., 2009; King, 2009).

No intuito de promover maior bem-estar e reduzir a resposta de estresse durante o transporte de peixes vivos, anestésicos sintéticos e naturais, em doses sedativas, têm sido utilizados adicionados à água. A sedação diminui os movimentos corporais e respiratórios, reduz a demanda por oxigênio por diminuição da taxa metabólica e, consequentemente, reduz os níveis de excreção de amônia durante o transporte (Zahl et al., 2012; Vanderzwalmen et al., 2018). Os anestésicos em doses de sedação podem, em muitos casos, auxiliar na mitigação dos

1 efeitos deletérios decorrentes do estresse fisiológico durante e após o transporte de peixes (Ross  
2 et al, 2007; Azambuja et al., 2011; Oyoo-okoth et al., 2011; Zeppenfeld et al., 2014; Barbas et  
3 al., 2017b).

4 Apesar do crescente uso de óleos essenciais (OE) ou seus compostos isolados como  
5 anestésicos e sedativos, a caracterização dos efeitos colaterais em peixes ainda é rara e os  
6 mecanismos de ação desses produtos naturais não são elucidados na maioria dos casos (Aydın  
7 e Barbas, 2020). Nesse sentido, a utilização de biomarcadores, além de permitir monitoramento  
8 dos níveis de eventuais danos à tecidos e moléculas, também possibilita uma avaliação do  
9 potencial antioxidante das diversas substâncias de origem vegetal utilizadas para atenuar o  
10 estresse durante o transporte de peixes (Barbas et al., 2017b, Teles et al., 2019)

11 Fisiologicamente, os peixes podem responder de várias formas quando submetidos à  
12 uma situação de estresse, uma delas é através de um aumento na produção das espécies reativas  
13 de oxigênio (ERO). Que já são produzidas no organismo em condições fisiológicas normais ou  
14 patológicas (Barbosa et al., 2010), porém, são contrabalanceadas por um sistema de defesa  
15 antioxidante. Eventualmente, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de pró-  
16 oxidantes e defesas antioxidantes, com prevalência da primeira, se estabelece uma condição de  
17 estresse oxidativo (Jones, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2015).

18 Os monoterpenos geraniol (GRL) e citronelol (CTR) são compostos químicos  
19 encontrados em várias espécies vegetais, como a planta *Cymbopogon nardus*. Esse terpenos  
20 possuem amplas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (Castro et  
21 al., 2010; Chen e Viljoen, 2010) e já tiveram suas atividades anestésicas descritas em juvenis  
22 de tambaqui com avaliação de marcadores eletrofisiológicos (De Araújo et al., 2021). No  
23 entanto, não se conhece os efeitos desses compostos sobre a resposta bioquímica nos diferentes  
24 tecidos de peixes quando expostos a essas substâncias.

25 O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie nativa dos rios Amazonas,  
26 Orinoco e afluentes, e possui relativa tolerância às variações da qualidade de água, com  
27 estratégias adaptativas que envolvem desde a expansão labial inferior que auxilia na captação  
28 do oxigênio atmosférico, a ajustes hematológicos e de regulação iônica (Araújo-Lima et al.,  
29 1997; Aride et al., 2007). Recentemente, esta espécie vem sendo reforçada como um bom  
30 modelo experimental devido a sua rusticidade, boa resistência ao manuseio e boa sensibilidade  
31 aos teste de novos produtos naturais anestésicos, sedativos, antiestressantes e antioxidantes  
32 (Barbas et al., 2016; Barbas et al., 2017a, b; De Souza et al., 2019; Vilhena et al, 2019; De  
33 Araújo et al., 2021).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o balanço oxidativo de juvenis de tambaqui submetidos ao transporte simulado por diferentes tempos em água contendo concentrações sedativas de geraniol e citronelol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição dos animais e aclimação

Foram utilizados 360 juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* ( $26,97 \pm 3,73$  g e  $11,93 \pm 0,44$  cm, comprimento total) provenientes de fazenda comercial. Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais do Instituto Federal do Pará – IFPA (Protocolo número CEUA nº 6686081118, ID 000021).

Os animais foram mantidos no Laboratório de Aquacultura de Espécies Tropicais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – IFPA – *Campus Castanhal*, acondicionados em tanque circular de 300 L com sistema de recirculação com qualidade da água monitorada diariamente: temperatura  $26 \pm 3$  °C; pH  $6,2 \pm 1,1$ ; OD  $6,43 \pm 2,01$ . O fotoperíodo foi fixado em 12 h C: 12 h E. A alimentação (ração comercial – 32% de proteína) foi ofertada três vezes ao dia até a saciedade aparente.

### 2.2 Delineamento experimental

As soluções-estoque de GRL e CTL foram preparadas a partir de sua diluição em etanol (96%) na proporção 1:9. Os anestésicos foram utilizados em doses sedativas (15% da dose efetiva) com base nas concentrações que induziram à anestesia profunda e rápida ( $< 3$ min) em juvenis de tambaqui encontradas por De Araújo et al. (2021). Desta forma, as doses estabelecidas para o presente estudo foram  $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$  e  $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ , para o GRL e CTL, respectivamente.

Foram utilizados sacos plásticos de polietileno (volume útil de 30 L), adicionados de água (5L) e injetados com oxigênio puro na proporção de 1:3 (água: oxigênio) e posteriormente vedados e armazenados em caixas térmicas (170 L), agitadas manualmente (3 agitações na caixa a cada 30 minutos) para simulação de movimentação do transporte.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente na densidade de 10 animais/ saco ( $\sim 166$  g  $\text{L}^{-1}$ ) em 12 tratamentos com 3 repetição cada ( $n=30/\text{tratamento}$ ). Os tratamentos consistiram em transporte simulado por 2, 6 e 10 horas com GRL (GRL-02, GRL-06 e GRL-10) e CTL (CTL-

02, CTL-06 e CTL-10), separadamente, e dois controles, peixes transportados por 2, 6 e 10h em água livre de anestésico (CRT-02, CRT-06 e CRT-10) e em água adicionada de etanol, que foi o utilizado na diluição (ETN-02, ETN-06 e ETN-10) na maior quantidade utilizada para a diluição.

### 2.3 *Análises dos parâmetros de qualidade da água*

Antes e após o transporte foram avaliados os parâmetros de qualidade a seguir: oxigênio dissolvido – OD ( $\text{mg L}^{-1}$ ), pH e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), que foram medidos usando um equipamento multiparâmetro (HANNA™ HI9828). A amônia ( $\text{mg L}^{-1}$ ) foi determinada seguindo metodologia da Unesco (1983), o nitrito ( $\text{mg L}^{-1} \text{N-NO}_2$ ) foi determinando de acordo com Bendschneider e Robinson (1952) e a alcalinidade ( $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) avaliada de acordo com Eaton et al. (2005).

### 2.4 *Análises dos Parâmetros de Estresse Oxidativo*

#### 2.4.1 *Coleta e Preparação de Tecidos*

Após o final de cada tempo de transporte, quatro juvenis por réplica (saco), totalizando um “n” de 12 animais por tratamento, foram pesados e sacrificados por secção da medula espinhal. De cada indivíduo foram coletados e pesados amostras de brânquia, cérebro, fígado e músculo e estocados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram homogeneizados na proporção de 1:5 (p/v) em tampão (Tris-HCl – 100 mM; EDTA – 2 mM; e  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 5 mM) (Da Rocha et al., 2009) e os sobrenadantes resultantes da centrifugação dos homogenados ( $10\,000 \times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização das análises.

#### 2.4.2 *Proteínas totais*

Inicialmente foi feita a quantificação de proteínas totais, realizada por meio do método de biureto, utilizando kit comercial, com leituras feitas em triplicata, utilizando espectrofluorímetro (550 nm).

#### 2.4.3 *Capacidade Antioxidante Total contra radicais peroxil (ACAP)*

Para determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil nos tecidos, foi utilizada a metodologia proposta por Amado et al. (2009) que consiste em quantificar a capacidade antioxidante dos tecidos utilizando-se um substrato fluorescente (2', 7 dia diclorofluoresceína diacetato – H2DCF-DA) e a produção de radicais peroxil por decomposição térmica de ABAP (dicloridrato de 2,2'-azobis 2 metilpropionamidina). As amostras foram padronizadas em  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteína. A fluorescência foi determinada através de um

espectrofluorímetro a 37 ° C, 485 nm e 530 nm com leituras a cada 5 minutos num período de tempo de 30 minutos. Os resultados foram expressos em área relativa, isto é, a diferença entre a área com e sem ABAP, dividida pela área sem ABAP. Para fins de interpretação dos resultados, uma menor área relativa significa uma maior capacidade antioxidante.

#### 2.4.4 Concentração do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e níveis de grupos sulfidrilas proteicos (P-SH)

As análises foram realizadas pelo método de White et al. (2003) e Chen et al. (2008) com modificações.

O protocolo baseia-se na medição da concentração de GSH pela sua reação com DTNB (5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico). Para o ensaio, 100 µL de sobrenadante, 200 µL de solução de reação (Tris-base 0,4M, pH = 8,9) e 40 µL de DTNB foram então transferidos para microplaca e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro com leitor de placas. A concentração foi expressa em µmoles de GSH por mg proteína<sup>-1</sup>.

A concentração do grupo P-SH foi determinada por sua reação com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2 - nitrobenzóico)). Para o ensaio, 240 µL de amostra e 28 µL de ácido tricloroacético (TCA, 50%) foram adicionados aos tubos eppendorf e centrifugados a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos, o precipitado de GSH foi usado e ressuspenso usando 200 µL de tampão de homogeneização para posterior homogeneização. Finalmente, 100 µL de sobrenadante, 160 µL de solução de reação (Tris-base 0,2 M, pH = 8,2) e 40 µL de DTNB foram transferidos para microplacas e incubados por 15 minutos. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro com leitor de placas (Biotek Synergy HT), à temperatura ambiente. A concentração foi expressa em nmol-SH por mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 2.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos de acordo com Oakes e Van Der Kraak (2003). Para determinar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pela quantificação do malondialdeído (MDA), as amostras (brânquias: 40 µL; fígado: 80 µL; cérebro: 50 µL e músculo: 100 µL) foram adicionadas a uma solução contendo 20 µL de solução de BHT (67 µM), 150 µL de solução de ácido acético a 20%, 150 µL solução de TBA 0,8%, 50 µL de água destilada e 20 µL de SDS a 8,1%. As amostras foram incubadas a 95 °C por 30 min. Posteriormente, 100 µL de água destilada e 500 µL de n-butanol foram adicionados à solução final. O sobrenadante remanescente após a centrifugação (3000 x g, 10 minutos, 15 °C) foi

utilizado para determinar a fluorescência (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) e os resultados foram expressos em nmol MDA mg de tecido úmido<sup>-1</sup>.

### 2.5 Análises estatística

A normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram verificados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Quando não sendo atendidos esses pressupostos, o valores foram transformados em Log<sub>10</sub> previamente às análises. Posteriormente, as comparações dos valores médios foram feitas através de ANOVA de duas vias utilizando-se o tempo de transporte e os tratamentos (anestésicos e controles) como fatores, e as diferenças entre as médias foram verificadas com o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$  em todos os casos. Todas as análises foram efetuadas através do software GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.

## 3. RESULTADOS

Independentemente do tempo de transporte ou da presença ou não de anestésico na água de transporte, não foram observadas mortalidades. Não foram observadas diferenças entre os grupos controles (controle água e etanol) em relação aos parâmetros de qualidade de água e análises bioquímicas, portanto, os resultados do grupo etanol não foram considerados para comparações.

### 3.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água antes e após o transporte, estão apresentados na tabela 1. Os maiores valores de OD ( $p < 0,05$ ) foram observados nos grupos dos animais transportados até 2 horas independente do grupo experimental, e teve sua concentração diminuída gradualmente em níveis significantes ( $p < 0,05$ ) com o aumento do tempo de transporte dentro do mesmo grupo anestésico. O pH, temperatura e alcalinidade não apresentaram diferenças estatísticas significativas nem em função do tempo de transporte, nem entre os diferentes tratamentos.

O valores de nitrito e amônia tiveram aumento significativo em todos os grupos independentemente da duração do transporte ou da presença de anestésicos, em comparação com a água antes do transporte. Os maiores níveis de amônia ( $p < 0,05$ ) foram observados nos

sacos dos animais transportados por 10 horas, porém não diferiram em relação aos diferentes tratamentos.

Tabela 1: Médias  $\pm$  desvio padrão (DP) dos parâmetros de qualidade da água antes e após transporte de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, em diferentes tempos (2, 6 e 10 horas) com ou sem adição de Geraniol (10,5  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol (13,5  $\mu\text{L L}^{-1}$ ).

| Parâmetros                                                | Tempo(h) | Controle                         | Geraniol                         | Citronelol                       |
|-----------------------------------------------------------|----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <b>DO<br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b>                         | 00       |                                  | 5,31 $\pm$ 0,44                  |                                  |
|                                                           | 02       | 8,79 $\pm$ 0,08 <sup>Aa*</sup>   | 8,87 $\pm$ 0,14 <sup>Aa *</sup>  | 8,91 $\pm$ 0,31 <sup>Aa*</sup>   |
|                                                           | 06       | 6,11 $\pm$ 0,22 <sup>Ab*</sup>   | 5,99 $\pm$ 0,02 <sup>Ab</sup>    | 5,68 $\pm$ 0,52 <sup>Ab</sup>    |
|                                                           | 10       | 4,14 $\pm$ 0,06 <sup>Ac*</sup>   | 3,47 $\pm$ 0,02 <sup>Ac*</sup>   | 4,08 $\pm$ 0,23 <sup>Ac*</sup>   |
| <b>pH</b>                                                 | 00       |                                  | 6,76 $\pm$ 0,06                  |                                  |
|                                                           | 02       | 6,46 $\pm$ 0,01 <sup>Aa</sup>    | 6,59 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>    | 6,61 $\pm$ 0,12 <sup>Aa</sup>    |
|                                                           | 06       | 6,49 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>    | 6,63 $\pm$ 0,02 <sup>Aa</sup>    | 6,54 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>    |
|                                                           | 10       | 6,56 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>    | 6,57 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>    | 6,43 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>    |
| <b>T °C</b>                                               | 00       |                                  | 27,59 $\pm$ 0,62                 |                                  |
|                                                           | 02       | 26,93 $\pm$ 0,82 <sup>Aa</sup>   | 26,66 $\pm$ 0,63 <sup>Aa</sup>   | 26,75 $\pm$ 0,79 <sup>Aa</sup>   |
|                                                           | 06       | 28,03 $\pm$ 0,74 <sup>Aa</sup>   | 27,11 $\pm$ 0,72 <sup>Aa</sup>   | 27,88 $\pm$ 0,83 <sup>Aa</sup>   |
|                                                           | 10       | 27,61 $\pm$ 0,75 <sup>Aa</sup>   | 27,75 $\pm$ 0,73 <sup>Aa</sup>   | 27,66 $\pm$ 0,77 <sup>Aa</sup>   |
| <b>Nitrito<br/>(mg L<sup>-1</sup> N-NO<sub>2</sub>)</b>   | 00       |                                  | 0,16 $\pm$ 0,002                 |                                  |
|                                                           | 02       | 0,58 $\pm$ 0,01 <sup>Aa*</sup>   | 0,57 $\pm$ 0,21 <sup>Aa*</sup>   | 0,58 $\pm$ 0,21 <sup>Aa*</sup>   |
|                                                           | 06       | 0,67 $\pm$ 0,01 <sup>Aa*</sup>   | 0,58 $\pm$ 0,32 <sup>Aa*</sup>   | 0,67 $\pm$ 0,11 <sup>Aa*</sup>   |
|                                                           | 10       | 0,93 $\pm$ 0,27 <sup>Ab*</sup>   | 0,80 $\pm$ 0,22 <sup>Aa*</sup>   | 0,74 $\pm$ 0,13 <sup>Aa*</sup>   |
| <b>Amônia Total<br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b>               | 00       |                                  | 0,005 $\pm$ 0,001                |                                  |
|                                                           | 02       | 0,009 $\pm$ 0,002 <sup>Ab*</sup> | 0,008 $\pm$ 0,004 <sup>Ab</sup>  | 0,006 $\pm$ 0,007 <sup>Ab</sup>  |
|                                                           | 06       | 0,015 $\pm$ 0,021 <sup>Ab*</sup> | 0,014 $\pm$ 0,035 <sup>Ab*</sup> | 0,015 $\pm$ 0,003 <sup>Ab*</sup> |
|                                                           | 10       | 1,111 $\pm$ 0,012 <sup>Aa*</sup> | 1,013 $\pm$ 0,015 <sup>Aa*</sup> | 1,122 $\pm$ 0,019 <sup>Aa*</sup> |
| <b>Alcalinidade<br/>(CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>)</b> | 00       |                                  | 59,3 $\pm$ 4,01                  |                                  |
|                                                           | 02       | 59,45 $\pm$ 2,29 <sup>Aa</sup>   | 59,24 $\pm$ 1,98 <sup>Aa</sup>   | 58,29 $\pm$ 1,03 <sup>Aa</sup>   |
|                                                           | 06       | 61,22 $\pm$ 3,26 <sup>Aa</sup>   | 63,06 $\pm$ 1,92 <sup>Aa</sup>   | 64,02 $\pm$ 1,57 <sup>Aa</sup>   |
|                                                           | 10       | 63,66 $\pm$ 4,01 <sup>Aa</sup>   | 65,19 $\pm$ 2,16 <sup>Aa</sup>   | 65,14 $\pm$ 1,80 <sup>Aa</sup>   |

Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas na mesma linha, indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésico e entre tempos. Asteriscos indicam diferenças em relação ao tempo zero (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

### 3.2 Capacidade Antioxidante Total contra radicais peroxil (ACAP)

Ao término do tempo de transporte, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante total das brânquias dos animais do grupo controle (fig. 2 A) nos diferentes tempos de transporte dentro desse grupo, sendo a menor área relativa dos animais transportados por 2 horas, seguido do grupo transportado por 6 horas e por fim, a maior área

relativa no animais transportados por 10h. Esse último foi maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao GRL e CTL após 10h, ou seja, com menor capacidade antioxidante.

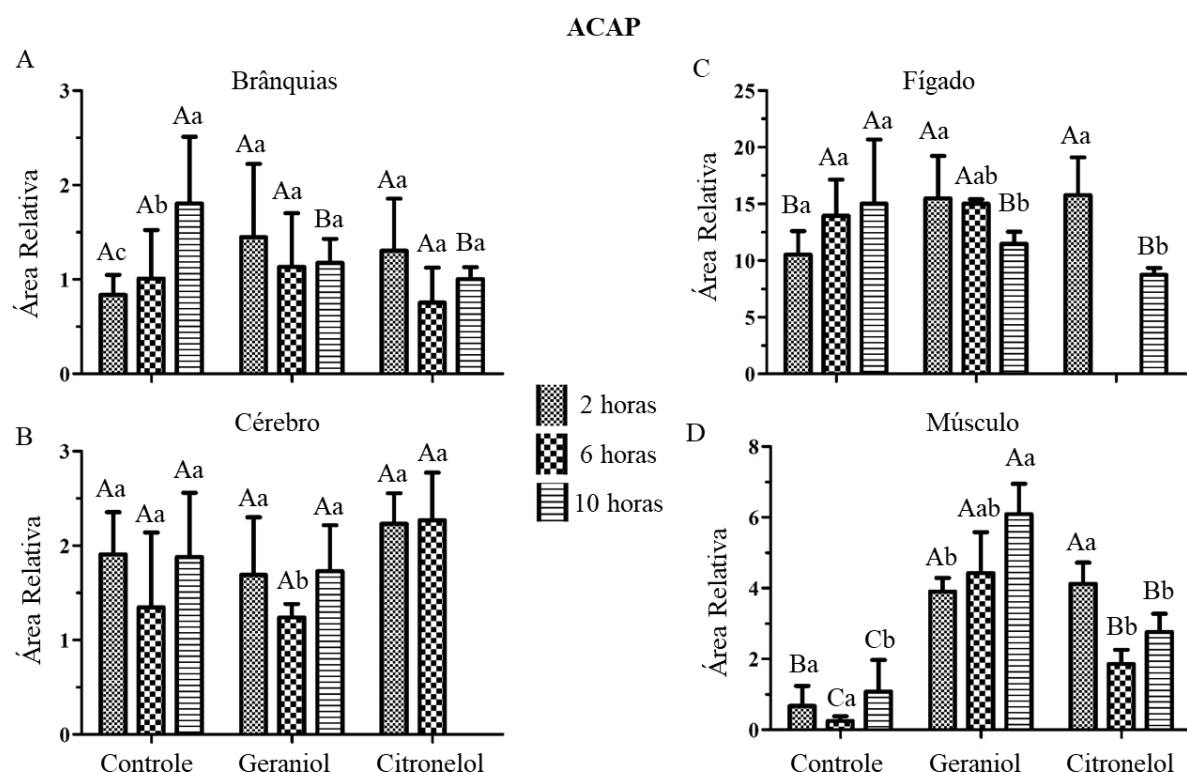


Figura 1: Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil nas Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado(C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempos (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas, indicam deferenças significativas dentro do mesmo anestésico em tempos diferentes. (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

No cérebro (fig 2 B), apenas o grupo CTL transportado por 2 horas apresentou maior área relativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e GRL. Enquanto que no fígado (fig 2 C), tanto o grupo GRL quanto o CTL 2 horas apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) áreas relativas em relação ao grupo controle. Diferenças entre os tempos dentro do mesmo anestésico foram encontradas no grupo CTL, onde os animais transportados por 2 horas apresentaram maior área relativa ( $p < 0,05$ ) em relação às 6 e 10 horas.

No músculo (fig 2 D), o grupo controle apresentou as menores áreas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao GRL e CTL, nos três tempos de transporte. Quando comparado os diferentes

anestésicos, o grupo GRL apresentou a maior área relativa em relação aos demais após 6 e 10 horas de transporte.

### 3.3 Concentração do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e níveis de grupos sulfidrilas proteicos (P-SH)

Os resultados das análises de GSH nas brânquias (fig 3 A) mostraram que para o grupo controle, o tempo de transporte não influenciou nas concentrações de GSH. No entanto, quando feita comparação entre os grupos anestésicos, após 2 horas de transporte os níveis de GSH foram maiores nos grupos GRL diferindo ( $p < 0,05$ ) do grupo controle e CTL. A partir das 6 e 10 horas de transporte, os maiores níveis ( $p < 0,05$ ) foram encontrados nos animais do CTL diferindo grupo controle e GRL. Em relação ao tempo de transporte dentro do mesmo grupo, o GRL apresentou níveis decrescente ( $p < 0,05$ ) com o aumento no tempo de transporte.

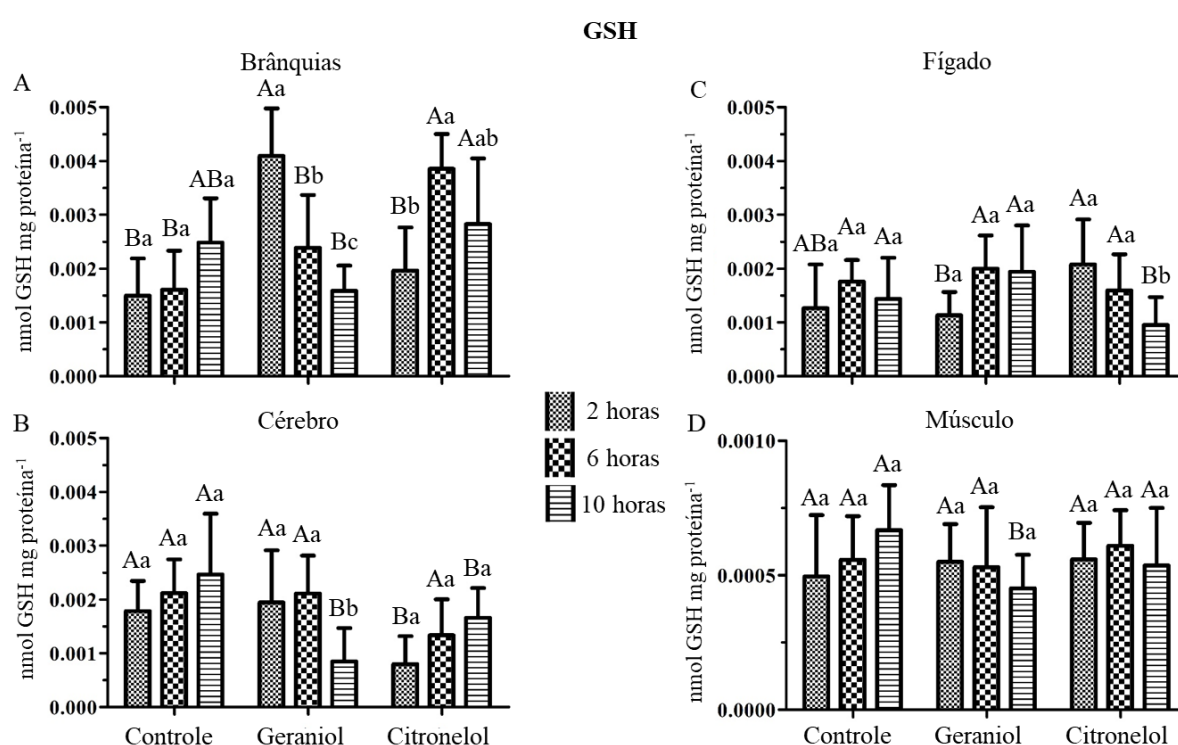


Figura 2: Determinação da atividade de GSH nas Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado (C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempos (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol (10,5 µL L<sup>-1</sup>) e Citronelol (13,5 µL L<sup>-1</sup>) na água. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésico em tempos diferentes. (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Quando analisado o cérebro (fig 3 B) no grupo GRL, as menores concentrações de GSH foram encontradas após 10h de transporte, sendo menor também ( $p < 0,05$ ) dos demais tempos de transporte quando feitas comparações dentro do mesmo anestésico. No grupo CTL para esse mesmo tecido, não foram encontradas diferenças ( $p > 0,05$ ) em relação ao tempo de transporte com essa substância, no entanto, quando comparado ao controle e GRL, os menores níveis de GSH ( $p < 0,05$ ) foram encontrados após 2h de transporte com CTL.

No fígado (fig 3 C), os níveis de GSH foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais transportados com CTL após 2h em relação ao controle e GRL. No entanto, após 10h de transporte, os animais transportados com essa substância apresentaram as menores ( $p < 0,05$ ) concentrações de GSH e também quando comparado o tempo de transporte dentro do mesmo anestésico.

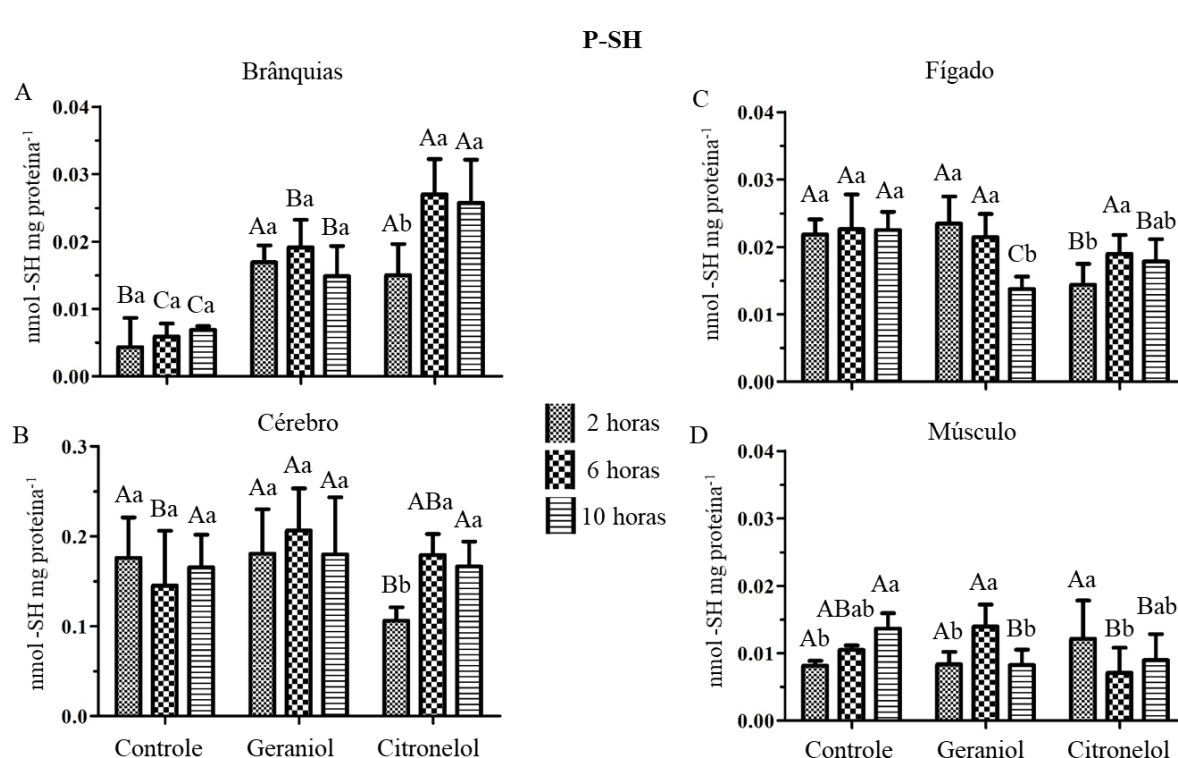


Figura 3: Determinação do teor de grupos sulfidril associados à proteína (P-SH) em Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado (C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempos (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol ( $10,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) e Citronelol ( $13,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ) na água. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésico em tempos diferentes (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Em relação aos níveis de P-SH, nas brânquias (fig 4 A), os animais controle mais uma vez não foram influenciados pelo tempo de transporte. No entanto, foi o grupo com os menores níveis de P-SH ( $p < 0,05$ ) em relação ao GRL e CTL em todos os tempos de transporte. Os

maiores ( $p < 0,05$ ) níveis de P-SH foram encontrados nos grupos CTL 6 e 10h, que também apresentaram as maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações quando comparados entre tempos de transporte, dentro do mesmo anestésico.

No cérebro (fig 4 B), quando avaliado os níveis de P-SH entre os diferentes anestésicos, as maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações foram encontradas no grupo GRL após 6h de transporte e as menores ( $p < 0,05$ ) no grupos CTL após 2h, sendo esse tempo menor ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo anestésico. No fígado (fig 4 C), as menores concentrações foram encontradas após 2h de transporte no grupo CTL. E dentro do mesmo anestésico, após 10h no grupo transportado com GRL foram encontrados os menores ( $p < 0,05$ ) níveis de P-SH.

Já em relação ao músculo (fig 4 D), dentro do grupo controle quando comparados os tempo de transporte, os maiores ( $p < 0,05$ ) níveis de P-SH foram encontrados após 10h. Em relação às variações dentro do mesmo tempo de transporte, o controle também foi maior ( $p < 0,05$ ) comparado a GRL e CTL após 10h de transporte. Após 6h, os maiores ( $p < 0,05$ ) níveis de P-SH, foram encontrados nos animais transportados com GRL. No grupo CTL, quando comparado o tempo de transporte dentro do mesmo anestésico, os maiores ( $p < 0,05$ ) níveis foram encontrados após 2h de transporte.

#### 3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Quando analisados os níveis de MDA nas brânquias (fig 4 A), quanto ao tempo de transporte nos diferentes tratamentos, o controle apresentou maiores níveis de MDA ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao GRL 6 e 10 horas, e também em relação ao controle com CTL 2 horas para o fígado, onde apresentaram menores níveis de MDA.

Por outro lado, no cérebro (fig 4 B), quando avaliados o tempo de transporte entre os anestésicos, o grupo controle e GRL apresentaram resultados semelhantes com maiores níveis de MDA nos animais transportados por 6h, e uma redução nos animais transportados por 10h, diferenciando ( $p < 0,05$ ) dos transportados com CTL. Nesse grupo, os maiores níveis ( $p < 0,05$ ) foram encontrados nos animais transportados por 2h. Ainda nesse tecido, quando analisados a influência do tempo de transporte dentro do mesmo grupo, foram encontradas diferenças ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos, no entanto, sem relação aparentemente definida. No fígado, assim como nas brânquias, não foram encontradas diferenças ( $p > 0,05$ ) em relação ao tempo de transporte dentro do mesmo anestésico, nesse tecido, os maiores níveis ( $p < 0,05$ ) foram encontrados nos animais transportados por 2h no grupo CTL (fig 4 C).

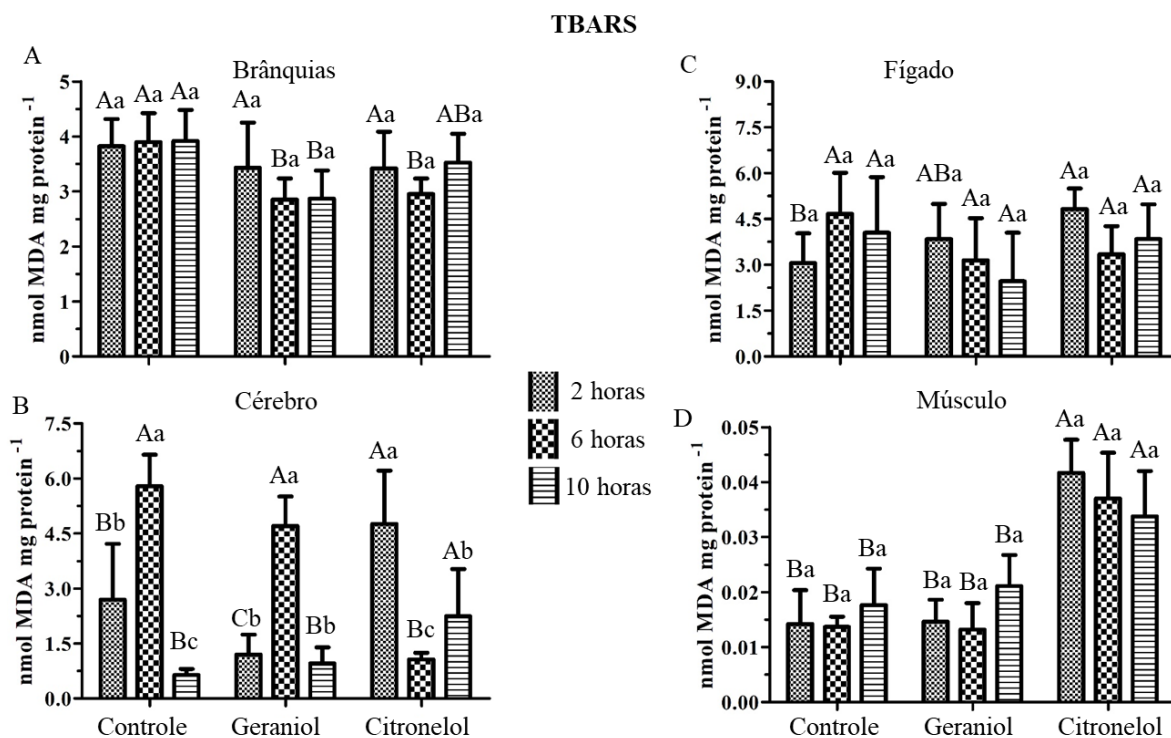


Figura 4: Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas Brânquias (A); Cérebro (B); Fígado (C); e Músculo (D) de juvenis de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, após transporte em diferentes tempos (2, 6 e 10h) na presença ou ausência (Controle) de concentrações sedativas de Geraniol (10,5 µL L<sup>-1</sup>) e Citronelol (13,5 µL L<sup>-1</sup>) na água. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os anestésicos dentro do mesmo tempo, enquanto que letras minúsculas, indicam diferenças significativas dentro do mesmo anestésico em tempos diferentes. (ANOVA 2 vias, teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Quando analisado o músculo (fig 4 D), em nenhum dos grupos houve influência no tempo de transporte ( $p > 0,05$ ) nos níveis de MDA. Em relação ao mesmo tempo de transporte nos diferentes anestésicos, no grupo CTL foram encontrados os maiores níveis de MDA, diferindo ( $p < 0,05$ ) dos grupos controle e GRL nos tempos 2, 6 e 10 horas.

#### 4. DISCUSSÃO

O tambaqui, *C. macropomum*, por ser uma espécie de hábito migratório quando em seu ambiente natural, está adaptado à grandes variações físicas e químicas principalmente àquelas relacionadas ao pH, temperatura, e teor de oxigênio dissolvido, sem comprometimento fisiológico (Araújo-lima e Goulding, 1997; Sevilla e Günther, 2000). No presente estudo, os parâmetros de qualidade de água pH, temperatura e alcalinidade não variaram significativamente após o transporte em relação ao pré-transporte. Por outro lado, as

1 concentrações de OD reduziram gradualmente com o aumento no tempo de transporte, e os  
2 níveis de nitrito e amônia foram aumentadas após todos os tempos de transporte.

3 Em nosso estudo, apesar de apresentarem diferenças significativas ao longo do tempo  
4 de transporte, os níveis OD foram considerados adequados para o tambaqui. Quando  
5 considerado o ambiente natural, a espécie é conhecidamente resistente à hipóxia, suportando  
6 níveis de OD de 1 e até mesmo 0,5 mg L<sup>-1</sup>, e os valores indicados para sua criação são acima  
7 de 3 mg L<sup>-1</sup> (Saint-Paul, 1984a,b; Saint-Paul, 1986). Os níveis de nitrito também se mantiveram  
8 dentro faixa recomendada para a espécie de até 1,82 mg L<sup>-1</sup>. A amônia total é um subproduto  
9 gerado pelo metabolismo dos peixes, excretado principalmente pelas brânquias por difusão  
10 (Baldisserotto, 2013), como não teve renovação da água, esse acúmulo é esperado. No geral,  
11 os anestésicos adicionados à água do transporte não influenciaram diretamente nas variações  
12 dos parâmetros de qualidade de água, que se manteve adequada à espécie (Saint-Paul, 1984a,b;  
13 Saint-Paul, 1986; Gomes et al., 2013).

14 É crescente as pesquisas em relação aos efeitos de novos agentes anestésicos como  
15 protetores antioxidantes para peixes. A competência antioxidante nas brânquias foi  
16 consideravelmente maior nos grupos anestesiados em relação ao grupo controle, quando  
17 considerados as 6 e 10 horas de transporte. A ACAP fornece informações sobre o estado  
18 antioxidante geral do peixe, sem distinguir entre componentes enzimáticos e não enzimáticos  
19 (Amado et al., 2009). Nisso, o efeito protetor pode ser corroborado pelas maiores concentração  
20 de P-SH que foram mais elevadas nos grupos GRL e CTL em relação ao controle,  
21 independentemente do tempo de transporte, indicando menos danos proteicos nesse tecido,  
22 confirmado pelos níveis de lipoperoxidação (LPO), já que os níveis de P-SH é um indicativo  
23 de oxidação de proteínas.

24 Foram encontradas maiores concentrações de GSH nos grupos anestesiados. A GSH  
25 possui papel preponderante no mecanismo antioxidante, participando de reações enzimáticas  
26 como coenzimas, além de estar envolvida em vários processos fisiológicos, como na defesa  
27 antioxidante e desintoxicação de xenobióticos e protegendo as células dos radicais livres  
28 (Stephensen et al., 2002; Halliwell e Gutteridge, 2015). Quando analisadas as concentrações de  
29 GSH nas brânquias dos animais transportados com GRL, observou-se uma redução gradual nos  
30 níveis de GSH, o que pode estar relacionada ao aumento da demanda de GSH à reação dos  
31 organismos ao estresse oxidativo, ou por ser um captador de radicais, pode ter reagido  
32 diretamente com EROs, atenuando os efeitos deletérios das espécies ativas de oxigênio que não  
33 foram metabolizadas pelo sistema enzimático de defesas antioxidantes (Droge 2002). No grupo

CTL, os níveis de GSH também se mantiveram elevados após 6h de transporte, logo, sugerindo um efeito protetor desses anestésicos, já que foram capazes de promover alterações no sistema antioxidante nas brânquias, sendo que no grupo controle os níveis se mostraram inferiores.

Resultados similares foram encontrados por Azambuja et al. (2011), onde foi observado um efeito protetor do OE *Lippia alba* em brânquias de jundiás transportados por 7 horas, indicado pela diminuição dos níveis de TBARS em comparação com peixes transportados sem anestésico pelo mesmo tempo. Assim como os encontrados por Barbas et al. (2017b) para o tambaqui após 10 horas de transporte com o uso do OE de *Nectandra grandiflora*, onde os autores constataram uma concentração 39,5% menor nos níveis de MDA (LPO) nas brânquias em relação aos animais controle, atribuindo a esse OE um efeito protetor.

De modo geral, esse efeito antioxidante nas brânquias é importante, considerando que esse tecido exerce contato íntimo com a água, sendo, portanto, bastante sensível às alterações químicas e físicas do ambiente e à presença de xenobióticos, com danos que podem prejudicar sua atividade multifuncional (Wood, 2017). Embora a atividade antioxidante seja uma possível indicadora de estresse oxidativo, cada órgão, tecido e organismo têm repostas antioxidantes diferentes (Amado et al. 2009). Nossos resultados demonstram resultados distintos para cada tecido avaliado.

Em nosso estudo, esse efeito protetor nas brânquias ou pode estar relacionado ao potencial antioxidante já demonstrados por essas substâncias em outros organism, ou ainda, em função das propriedades anestésicas com redução no batimento opercular e conseqüentemente redução no metabolismo, que implica em maior disponibilidade de antioxidantes e menos danos. Já que em condições fisiológicas normais, as brânquias apresentam alta taxa metabólica para a manutenção do metabolismo (Mommsen, 1984).

Quanto ao cérebro e fígado, esses tecidos possuem alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, logo, estão mais susceptíveis aos danos oxidativos e LPO (Halliwell, 2015; Jhamtani et al., 2017). De modo geral, não foram observadas alterações marcantes na capacidade antioxidante em relação ao cérebro, que permaneceu com valores similares aos resultados do grupo controle, sem efeito aparente decorrente do uso dos anestésicos testados. Para o fígado, o uso de anestésico parece ter contribuído para a diminuição na competência antioxidante após 2 horas de transporte com CTL, com conseqüente aumento nos níveis de LPO em relação ao controle, mesmo com um aumento na capacidade antioxidante após 10h de transporte, os níveis de GSH e P-SH foram reduzidos quando comparados ao controle.

Quando analisado o músculo em ambos grupos anestésicos, os animais apresentaram maior vulnerabilidade aos danos oxidativos, ou seja, maior área relativa, indicando uma supressão da defesa. Os níveis de GSH e P-SH não apresentaram grandes variações nesse tecido e mesmo que a capacidade antioxidante no músculo do grupo GRL tenha sido menor, quando avaliado os níveis de MDA, nenhum acréscimo nos níveis de LPO foi registrado para os animais transportados nesse grupo, mantendo seus níveis nas condições do grupo controle.

Por outro lado, quando avaliado o músculo no grupo CTL, os níveis de LPO foram consideravelmente mais elevados independente do tempo de transporte. O aumento nos níveis de MDA indicam dano na membrana, o que pode indicar que os animais apresentaram uma condição de estresse oxidativo, assim, podemos considerar que essa substância estimulou a geração de EROs no músculo dos animais expostos, mostrando um possível efeito pró-oxidante. Apesar do uso de anestésico/sedativo promover a diminuição do metabolismo e menor atividade natatória dos animais, essa condição poderia ser explicada pela intensa atividade muscular apresentada nos animais antes de atingir anestesia como descrito por De Araújo et al. (2021).

Concluindo, o uso do GRL em dose sedativa durante o transporte se apresenta como uma boa opção, já que foi capaz de atenuar os danos oxidativos principalmente nas brânquias pós-transporte. Por outro lado, o CTL demonstrou uma ação mais pro-oxidante, resultando em altos níveis de LPO no músculo, indicando não ser apropriado como alternativa de sedativo para mitigar o estresse durante esse tipo de manejo. Por fim, futuros trabalhos são ainda necessários para uma caracterização mais detalhada das alterações fisiológicas promovidas por essas substâncias quando utilizadas por longas horas, ou até poucos dias, em doses sedativas.

## REFERÊNCIAS

- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S, Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407(6), 2115-2123.
- Anjos, G.M., Martins, A.S., Soares, E.C., Melo, J., Santos, E.J.S., Dantas, L.H.N., 2011. Eugenol, sal e gesso no transporte de tambaqui em sistemas fechados. *PUBVET*, Londrina, v5, nº 10, Ed. 157.
- Araújo, E.R.L., Silva, J.S., Lopes, L.M., Torres, M.F., Alho da Costa, B.M.P., Amarante, C.B., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., Sampaio, L.A., 2021. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture* 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>.

- Araújo-Lima, C., Goulding, M., 1997. So fruitful fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. Columbia University Press, New York, 157p.
- Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., Garcia, L.O., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F., 2011. Effect of the essential oil of *i* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319, 156–161.
- Aydın, B., Barbas, L.A.L., 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 1–9 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>.
- Barbas, L.A.L., Stringhetta, G.R., Garcia, L.O., Figueiredo, M.R.C., Sampaio, L.A., 2016. 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, M., De Mello, V.J., Barbosa, R.P.M., De Lima, H.D.S.T., Torres, M.F., Do Nascimento, L.A.S., Da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Gomes, M.R.F., 2017a. Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*. 479, 60 – 68.
- Barbas, L.A.L., Maltez, L.C., Stringhetta, G.R., de Garcia, L.O., Monserrat, J.M., da Silva, D.T., Heinzmann, B.M., Sampaio, L.A., 2017b. Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 469, 79–87.
- Barbas, L.A.L., Torres, M.F., da Costa, B.M.P.A., Feitosa, M.J.M., Maltez, L.C., Amado, L.L., Toda, Y.P.S., Batista, P.S., Cabral, D.A.C., Hamoy, M., 2021. Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. *Aquat. Toxicol.* 231, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105734>.
- Belló, A.R.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B. & Bianchini, A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 233-236.
- Bendhack, F., 2004. Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de matrinxãs (*Brycon cephalus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo.
- Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87–96.
- Bridges, C.R.; Taylor, A.C.; Morris, S.J. and Grieshaber, M.K., 1984. Ecophysiological adaptations in *Blennius pholis* (L.) blood to intertidal rockpool environments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 77: 151-167.
- Chen, W., Viljoen, A.M., 2010. Geraniol – a review of a commercially important fragrance material. *S Afr J Bot.* 76, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Chen, W., Zhao, Y., Seefeldt, T., Guan, X., 2008. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J Pharm Biomed Anal* 48 (5), 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.08.033>.
- De Souza, A.S.L., Peret, A.C., Hamoy, M., De Souza, R.A.L., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture* 500, 160–169.

- 1 Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82  
2 (1),47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- 3 Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard Methods for the  
4 Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association,  
5 Springfield. (8p.)
- 6 Gomes, L.C., Araújo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., 2003a. Avaliação dos  
7 efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesq. agropec. bras.*,  
8 Brasília, v. 38, nº 2, 283-290.
- 9 Gomes, L.C.; Araújo-Lima, C.A.R.M.; Roubach, R., Chippari-Gomes, A.R.; Lopes, N.P.  
10 2003b. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile  
11 tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 76–84.
- 12 Gomes, L.C.; Araújo-Lima, C.A.R.M.; Chippari-Gomes, A.R.; Roubach, R. 2006.  
13 Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system.  
14 *Brazilian Journal of Biology*, 66: 493–502.
- 15 Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of*  
16 *Neurochemistry*, 97, 1634-1658.
- 17 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford. 5th ed.:  
18 Oxford University Press. EUA. 944.
- 19 Hammond. C.L., Madejczyk, M.S., Ballatori, N., 2004. Activation of plasma membrane  
20 reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol. Appl.*  
21 *Pharmacol.* 195: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.008>
- 22 Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsend, K.T., Evjen,T., 2005. Stress  
23 responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat  
24 transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*, 243: 373–382.
- 25 Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsend, K.T., Evjen,T., 2005. Stress  
26 responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat  
27 transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*, 243: 373–382.
- 28 Jhamtani, R.C., Shukla, S., Sivaperumal, P., Dahiya, M.S., Agarwal, R., 2017. Impact of co-  
29 exposure of aldrin and titanium dioxide nanoparticles at biochemical and molecular levels  
30 in Zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 58, 141-155.
- 31 King, H.R., 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport  
32 of Atlantic salmon in Tasmania. *Journal of Veterinary Behavior*, 4: 163–168.
- 33 Mommsen, T.P., 1984. Metabolism of the Fish Gill. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (eds.) *Fish*  
34 *Physiology*. Vol. XB. Orlando: Academic Press, 1984. p. 203-237.
- 35 Oakes, K.D., Kraak, V.D., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in  
36 white sucker (*Catostomus commersoni*) populations. *Aquat Toxicol* 63,447–463.  
37 [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7).
- 38 Oyoo-okoth, E., Cherop, L., Ngugi, C.C., Chepkirui-boit, V., Manguya-lusega, D., Ani-sabwa,  
39 J., Charo-karisa, H., 2011. Survival and physiological response of *Labeo victorianus* (Pisces:  
40 *Cyprinidae*, *Boulenger* 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient.  
41 *Aquaculture*, 319: 226–231.
- 42 Ross, L.G., Blanco, J.S., Martínez-Palacios, C., Racotta, I.S., Cuevas, M.T., 2007. Anesthesia,  
43 sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and  
44 hypothermia. *Aquac. Res.* 38, 909–917. DOI 10.1111/j.1365-2109.2006.01642.x.

- Saint-Paul, U., 1984a. Ecological and physiological investigations of *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. *Mems. Soc. Latinoam. Acuicult.* 5: 501-518.
- Saint-Paul, U., 1984b. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomun*, Serrasalminae. *Env. Biol. Fish.* 11: 53-62.
- Saint-Paul, U., 1986. Potential for aquaculture of south american freshwater fishes: a review. *Aquaculture.* 54: 205-240.
- Sevilla, A., Günther, J., 2000. Growth and feeding level in pre-weaning Tambaqui *Colossoma macropomum* larvae. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 218-224.
- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Toxicology and Pharmacology* 133, 435–442.
- Teles, M., Oliveira, M., Jerez-Cepa, I., Franco-Martínez, L., Tvarijonaviciute, A., Tort, L., Mancera, J.M., 2019. Transport and Recovery of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Sedated With Clove Oil and MS222: Effects on Oxidative Stress Status. *Front. Physiol.* 10:523. Doi: 10.3389/fphys.2019.00523
- Vilhena, C.S., Nascimento, L.A.S., Andrade, E.H.A., Silva, J.K.R., Hamoy, M., Torres, M.F., Barbas, L.A.L., 2019. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 510: 169-175.
- Weber, C.A.; Duncan, C.A.; Lyons, M.J., Jenkinson, S.G., 1990. Depletion of tissue glutathione with diethyl maleate enhances hyperbaric oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 258: L308-L312.
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 318, 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00143-X)
- Wood, C. M., de Souza Netto, J. G., Wilson, J. M., Duarte, R. M., Val, A. L., 2017. Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. *Journal of Comparative Physiology B.* 187 (1), 135 – 151. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1027-8>
- Zeppenfeld, C.C., Toni, C., Becker, A.G., Miron, D.S., Parodi, T.V., Barcellos, L.J.G., Koakoski, G., Rosa, J.G.S., Loro, V.L., Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418-419, 101-107.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de anestésicos na aquicultura tem ido além do objetivo meramente de contenção de animais, principalmente os de grande porte, sendo também uma questão de garantia de bem-estar animal.

O uso de extratos vegetais, geralmente óleos essenciais e seus isolados, tem sido empregados como alternativas aos anestésicos sintéticos comumente utilizados para peixes por serem opções de relativo fácil acesso e viáveis, com boa usabilidade quando administradas

1 corretamente e possibilitam uma recuperação rápida do efeito anestésico sem maiores  
2 intercorrências na maioria das vezes.

3 Considerando a complexidade na avaliação de novos fármacos para a anestesia de  
4 peixes, já que vários fatores são determinantes para a caracterização de sua eficácia além do  
5 monitoramento comportamental durante a indução e recuperação, vale ressaltar a importância  
6 de se ter informações adicionais.

7 Nesse sentido, o uso de marcadores, a exemplo dos eletrofisiológicos e bioquímicos,  
8 que corroborem os efeitos anestésicos e permitam um melhor entendimento quanto a eficácia  
9 ou até mesmo dos efeitos colaterais dessas substâncias em peixes, tem sido cada vez mais  
10 necessários, permitindo esclarecer os níveis de segurança e a eficácia na utilização quando  
11 estabelecidas as concentrações efetivas.

12 Os resultados obtidos no presente estudo apresentaram-se bem alinhados aos nossos  
13 objetivos, possibilitando a interpretação em profundidade dos efeitos fisiológicos provocados  
14 pelo geraniol e citrônolol, que podem ser produtos interessantes no contexto aquícola, tendo em  
15 vista serem disponíveis e de baixo custo de aquisição.

## 16 6. CONCLUSÕES

- 17  
18 • As substâncias geraniol (GRL) e citrônolol (CTL) nas dosagens 70  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 90  $\mu\text{L L}^{-1}$ ,  
19 respectivamente, mostraram efeito anestésicos em banho de curta duração em juvenis  
20 de tambaqui, *Colossoma macropomum* com tempos de indução e recuperação dentro do  
21 recomendado.
- 22 • O GRL e CTL nas condições experimentais do nosso trabalho foram capazes de  
23 promover miorelaxamento e redução transitória da ventilação branquial e  
24 consequentemente redução na frequência cardíaca. Esses efeitos foram mais intensos  
25 nos animais expostos ao CTL, porém, com recuperação completa quando em água livre  
26 de anestésico.
- 27 • O GRL se mostrou bastante seguro quanto a resposta cardíaca, com manutenção do  
28 ritmo sinusal durante a indução, com reversibilidade dos efeitos na recuperação. O CTL  
29 pareceu induzir a algum bloqueio atrioventricular e arritmia nos animais durante a  
30 indução. Mesmo ao fim do tempo de recuperação após exposição ao GRL, esses animais  
31 não apresentaram recuperação completa dos efeitos, de acordo com os respectivos  
32 indicadores no ECG, o que demanda alguma atenção adicional quanto ao seu uso.

- O CTL não promoveu adequada depressão do SNC de acordo com as análises de EEG, determinando, em contraste, excitabilidade neuronal durante a indução de curta duração. Experimentos que avaliem exposição ao CTL em maior tempo são necessários para verificar se nesses casos ocorreria anestesia geral com depressão generalizada do SNC.
- O GRL não promoveu danos oxidativos nos tecidos analisados e mostrou alguma resposta antioxidante com efeito protetor nas brânquias dos animais transportados em dose sedativa dessa substância. Por outro lado, o CTL mostrou ação pró-oxidante no músculo dos animais transportados em doses sedativas.
- Por fim, concluímos que o GRL pode ser considerado um anestésico eficaz para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* e potencialmente para outras espécies de peixes em doses anestésicas e sedativas, enquanto que o citrônolol, apesar de promover miorelaxamento e paralisação corporal completa, apresenta desvantagens importantes que deverão ser melhor investigadas antes se sua indicação para ampla utilização em peixes.