



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

HÉLINA DOS SANTOS NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE
ANESTÉSICOS EM *Oreochromis niloticus***

Dourados/MS
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

HÉLINA DOS SANTOS NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE
ANESTÉSICOS EM *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, por Héliana dos Santos Nascimento, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção, sob orientação de Prof^a Dr^a Alexeia Barufatti Grisolia e co-orientação de Dr. Bruno do Amaral Crispim.

Dourados - MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N244a Nascimento, Helina Dos Santos
Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de anestésicos em *Oreochromis niloticus* / Helina Dos Santos Nascimento --
Dourados: UFGD, 2018.
54f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Alexeia Barufatti Grisolia
Co-orientador: Bruno do Amaral Crispim

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. *Lippia alba*. 2. ensaio do cometa. 3. micronúcleo. 4. anestesia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE ANESTÉSICOS EM
Oreochromis niloticus”

POR

HÉLINA DOS SANTOS NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.


PROF.^a DR.^a ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA
ORIENTADORA – UFGD


PROF.^a DR.^a LUCILENE FINOTO VIANA
MEMBRO TITULAR – UEMS


PROF. DR. LUÍS ANTONIO KIOSHI AOKI INOUE
MEMBRO TITULAR – EMBRAPA/DOURADOS


PROF. DR. RICARDO BASSO ZANON
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 21 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me cercado de pessoas boas ao longo da minha caminhada até aqui, que tanto me incentivaram, ensinaram e nunca me deixaram desistir.

Sou grata à minha incrível família, em especial minha mãe Tânia, que sempre foi exemplo de força, honestidade e amor. Sempre me ensinou que com esforço e fé posso alcançar meus objetivos.

À minha irmã Hevelly pela ajuda, por ser companheira e amiga.

Aos meus grandes amigos, cujo apreço eu não consigo mensurar. Muito Obrigada mesmo, por estarem sempre ao meu lado, por se fazerem presentes em momentos bons e ruins, nunca me esquecerei de nossas reuniões e das boas risadas, Bruno C., Luiza F., Alexandre B., Felipe M., Rafaela T. e Juliana F.

À minha professora, orientadora, amiga e um pouco mãe Alexeia. Muito obrigada por ter acreditado em mim, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com a senhora e sua equipe. Minha admiração por você é infundável.

Aos meus amigos do laboratório de mutagênese ambiental e do laboratório biotecnologia aplicada a produção animal, que são também minha família. Obrigada pelos momentos de descontração, por toda ajuda e apoio e principalmente pela alegria que vocês transmitem.

Ao meu coorientador e amigo, Dr. Bruno do Amaral Crispim, por toda paciência e por compartilhar comigo o conhecimento que carrega. Muito obrigada por ter me ensinado tanto e por ser pra mim exemplo de coragem, perseverança, fé, alegria e lealdade.

À Dra. Lucilene Finoto, por toda ajuda e colaboração para a realização deste trabalho, pela amizade, carinho e consideração durante esses anos.

Ao Dr. Luís Inoue pelo apoio, auxílio e confiança durante os experimentos realizados na EMBRAPA.

À Embrapa Agropecuária Oeste, pela confiança em disponibilizar o espaço e os animais para o experimento.

À Universidade Federal da Grande Dourados por ter tido a oportunidade de cursar minha pós-graduação.

Aos órgãos financiadores Fundect e CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa e concessão de bolsa de pós-graduação.

À todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e possibilitou a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Tânia, como forma de agradecimento por tudo que fez por mim até hoje.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 06 |
| LISTA DE FIGURAS | 07 |
| LISTA DE TABELAS | 08 |
| RESUMO GERAL..... | 09 |
| CAPÍTULO I..... | 10 |
| 1. Introdução..... | 11 |
| 2. Uso de anestésicos em pisciculturas..... | 12 |
| 2.1 Óleos essenciais como anestésicos | 13 |
| 2.1.1. Óleo de Cravo..... | 14 |
| 2.1.2. Óleo essencial de <i>Lippia alba</i> | 15 |
| 2.2 Bioensaios para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade | 16 |
| 2.2.1. Mutagenicidade e Genotoxicidade | 17 |
| 2.3 Ensaio com os peixes..... | 20 |
| 2.3.1. <i>Oreochromis niloticus</i> (Cichlidae) | 20 |
| 3. Justificativa..... | 21 |
| 4. Referências | 22 |
| 5. Objetivos | 31 |
| 5.1 Objetivo geral | 31 |
| 5.2 Objetivos específicos | 31 |
| 6. Hipótese..... | 32 |
| CAPÍTULO II | 33 |
| ARTIGO: Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de anestésicos em <i>Oreochromis niloticus</i> | 34 |
| Resumo | 34 |
| Introdução..... | 35 |
| Métodos | 37 |
| Resultados | 42 |
| Discussão..... | 46 |
| Agradecimentos..... | 49 |
| Referências | 49 |
| ANEXO I: Normas da revista <i>Transactions of the American Fisheries Society</i>..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| OE | Óleo essencial |
| OEs | Óleos essenciais |
| MCN | Micronúcleo |
| IMT | Índice de mutagenicidade |
| IG | Índice de genotoxicidade |
| LA | <i>Lippia alba</i> |
| BZ | Benzocaína |
| EG | Eugenol |
| CV | Controle veículo |
| CP | Controle positivo |
| CN | Controle negativo |
| NTP | National Toxicology Program |
| FDA | Food and Drug Administration's |
| CVM | Center for Veterinary Medicine |
| DNOCS | Departamento Nacional de Obras Contra a Seca |
| SCG | Single cell gel |
| DAPI | Dicloreto de 4,6-diamino-2-fenil-indol |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PISQ | Programa Internacional e Segurança Química |
| PNUMA | Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente |
| SBMCTA | Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Óleo essencial de <i>Lippia alba</i> | 14 |
| Figura 2. Imagens da espécie de planta <i>Lippia alba</i> | 15 |
| Figura 3. Divisão celular indicando a formação de micronúcleos em células eucarióticas..... | 18 |
| Figura 4. Micrografia ilustrando alterações nucleares em eritrócitos de peixes..... | 18 |
| Figura 5. Ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> | 19 |
| Figura 6. Ensaio do cometa, eritrócitos de peixes, <i>Oreochromis niloticus</i> , analisado pelo software LUCIA comet assay..... | 20 |
| Figura 7. Imagem da espécie <i>Oreochromis niloticus</i> | 21 |

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE ANESTÉSICOS EM *Oreochromis niloticus*

| | |
|--|----|
| Figura 1. Comparação entre os períodos de 24, 48 e 72h em cada tratamento com os compostos anestésicos na espécie <i>Oreochromis niloticus</i> para tamanho da cauda (a), porcentagem de DNA na cauda (b) (parâmetros do ensaio do cometa) e índice de genotoxicidade baseado em alterações nucleares (c)..... | 42 |
| Figura 2. Comparação entre os períodos de 24, 48 e 72h em cada tratamento com os compostos anestésicos na espécie <i>Oreochromis niloticus</i> para o índice mutagenicidade... .. | 43 |
| Figura 3. Comparação entre os diferentes tratamentos com os compostos anestésicos nos períodos de 24, 48 e 72h na espécie <i>Oreochromis niloticus</i> para tamanho da cauda (a) e porcentagem de DNA na cauda (b) (parâmetros do ensaio do cometa) e índice de genotoxicidade baseado em alterações nucleares (c)..... | 44 |
| Figura 4. Comparação entre os diferentes tratamentos com os compostos anestésicos nos períodos de 24, 48 e 72h na espécie <i>Oreochromis niloticus</i> para o teste de micronúcleo..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de indução e recuperação aos diferentes anestésicos em *Oreochromis niloticus* .41

RESUMO GERAL

Anestésicos são úteis em procedimentos experimentais e manejo de peixe no campo, pois evitam danos físicos e estresse aos animais. O uso de anestésicos químicos de maneira inadequada pode ocasionar danos aos animais, como irritação nas brânquias, perda de muco e lesões nas córneas. A utilização de compostos naturais pode ser uma alternativa para minimização de estresse. O óleo essencial de *Lippia alba*, possui efeito anestésico e pesquisas vem sendo realizadas para que esse anestésico possa ser utilizado em pisciculturas. No entanto, torna-se relevante a realização de pesquisas que avaliem a potencialidade de indução de danos genotóxicos e mutagênicos destes anestésicos oriundos de compostos naturais em peixes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito mutagênico e genotóxico do óleo essencial de *L. alba* e comparar seus efeitos com anestésicos comerciais utilizados em *Oreochromis niloticus*. Para tanto, os peixes, *O. niloticus*, foram expostos a três anestésicos (Benzocaína[®], Eugenol[®] e óleo essencial de *L. alba*), onde foi observado o tempo de indução e recuperação à anestesia e posteriormente avaliados danos mutagênicos e genotóxicos em eritrócitos pisceos. Os dados biométricos dos peixes foram coletados para verificar se estes influenciam na quantidade de alterações genéticas encontradas no DNA. Os danos genéticos foram avaliados utilizando o ensaio do cometa, teste de micronúcleo e alterações nucleares. Os resultados demonstraram que o Eugenol[®] induziu os peixes à anestesia antes de 5 min e a recuperação de equilíbrio e natação normal não ultrapassou esse tempo. Os anestésicos Benzocaína[®] e OE de *L. alba*, induziram os peixes à anestesia em 10 min e o tempo de recuperação foi menor que 5 min. O tamanho e peso corporal (*O. niloticus*) não influenciaram nas alterações genéticas encontradas no DNA. Concluindo, os anestésicos apresentaram genotoxicidade em todos os tempos analisados. Porém a Benzocaína[®] e Eugenol[®] apresentaram maior genotoxicidade em 72 h. No entanto, o OE *L. alba* em 72h apresentou redução significativa de genotoxicidade, indicando que o tempo de depuração dos anestésicos pode influenciar na genotoxicidade. A mutagenicidade foi observada apenas nos anestésicos Eugenol[®] e Benzocaína[®]. Deste modo, o óleo essencial de *L. alba* torna-se alternativa viável aos compostos químicos convencionais, além de apresentar efeito genotóxico menor quando comparado aos demais anestésicos e não possuir efeito mutagênico.

Palavras-chave: *Lippia alba*, óleo essencial, Lucia comet assay.

ABSTRACT

Anesthetics are useful in experimental procedures and handling of fish in the field, as they avoid physical damage and stress to animals. The use of chemical anesthetics improperly can cause damage to animals, such as irritation of the gills, loss of mucus and lesions on the corneas. The use of natural compounds may be an alternative for stress minimization. The essential oil of *Lippia alba*, has an anesthetic effect and research has been carried out so that this anesthetic can be used in fish farms. However, it is relevant to carry out research that evaluates the potential of induction of genotoxic and mutagenic damages of these anesthetics from natural compounds in fish. Thus, the objective of this study was to evaluate the mutagenic and genotoxic effect of *L. alba* essential oil and to compare its effects with commercial anesthetics used in *Oreochromis niloticus*. For this, fish, *O. niloticus*, were exposed to three anesthetics (Benzocaine®, Eugenol® and essential oil of *L. alba*), where the induction and recovery time were observed under anesthesia and afterwards evaluated mutagenic and genotoxic damages in erythrocytes pisceos. The biometric data of the fish were collected to verify if they influence the amount of genetic alterations found in the DNA. Genetic damage was evaluated using the comet assay, micronucleus test and nuclear alterations. The results showed that Eugenol® induced the fish to anesthesia before 5 min and normal balance and swimming recovery did not exceed this time. The anesthetics Benzocaine® and EO from *L. alba* induced the fish to anesthesia in 10 min and the recovery time was less than 5 min. Size and body weight (*O. niloticus*) did not influence the genetic alterations found in DNA. In conclusion, anesthetics presented genotoxicity at all times analyzed. However, Benzocaine® and Eugenol® showed higher genotoxicity in 72h. However, the EO *L. alba* in 72h showed a significant reduction of genotoxicity, indicating that the clearance time of the anesthetics may influence the genotoxicity. Mutagenicity was observed only in anesthetics Eugenol® and Benzocaine®. In this way, the EO of *L. alba* becomes a viable alternative to the conventional chemical compounds, in addition to presenting a minor genotoxic effect when compared to other anesthetics and not having a mutagenic effect.

Keywords: *Lippia alba*, essential oil, Lucia comet assay.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A anestesia é um procedimento necessário para manuseio de peixes (Pimenta & França, 2012; Rocha et al., 2012; Torres et al., 2017). As práticas de manejo realizadas nas pisciculturas expõem os peixes a uma variedade de estressores, que podem afetar seu desempenho zootécnico como a sobrevivência, crescimento e reprodução (Souza et al., 2012). A utilização de anestésicos é necessária durante a marcação, biometria, transporte e análise patológica, a fim de facilitar o manejo, reduzir o estresse e evitar possíveis danos físicos aos animais (Maršić-Lucic et al., 2005).

O anestésico deve ser selecionado de acordo com sua disponibilidade e custo, porém tanto a segurança do peixe quanto a do manipulador deve ser priorizada, visando o bem-estar do animal e de quem o manuseia (Becker et al., 2012; Silva et al., 2012). No entanto, as substâncias químicas usadas como anestésicos podem causar danos aos peixes (Inoue et al., 2003; Júnior et al., 2014). Deste modo, pesquisas baseadas no uso de anestésicos provenientes de fontes naturais, como óleos essenciais e derivados de plantas, têm sido realizadas com a finalidade de demonstrar a possibilidade destes constituírem alternativa viável para anestesia em peixes (Façanha & Gomes, 2005; Cunha, 2007; Silva et al., 2013).

O óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, extraído da planta conhecida popularmente como erva-cidreira, tem sido utilizado na medicina popular, na forma de chá calmante, devido as suas propriedades terapêuticas. Pesquisas recentes *in vivo* e *in vitro* demonstraram o potencial bioativo do óleo, demonstrando propriedades antioxidante (Azambuja et al., 2011) antiparasitário (Soares et al., 2016). Dentre as potencialidades podemos destacar a inibição do crescimento de bactérias, fungos e protozoários (Nogueira et al., 2007; Escobar et al., 2010; Fabri et al., 2011; Almeida, 2016) e indução de efeito anestésico em organismos aquáticos (Parodi et al., 2012; Becker et al., 2012). No entanto, este OE não é tão utilizado em pisciculturas. Em decorrência disto, pesquisas testando a potencialidade do OE como anestésico em peixes vêm sendo realizadas (Veeck et al., 2013; Soares et al., 2016, Ventura, 2016).

Os peixes são amplamente utilizados como modelos experimentais, por apresentarem respostas aos compostos químicos de modo similar às de grandes vertebrados, além disso, são facilmente encontrados nos ecossistemas (Ramsdorf et al., 2009).

Segundo Sanchez-Galan (1998), uma espécie de peixe considerada ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade necessita apresentar ampla distribuição em ecossistemas variados, ser sensível para detectar substâncias químicas em baixas concentrações e apresentar fácil manuseio no laboratório. Deste modo, dentre as diversas espécies podemos destacar *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) por apresentar as condições anteriormente mencionadas. Além disso, a Tilápia do Nilo é um peixe amplamente cultivado e comercializado em pisciculturas no Brasil.

Diversas técnicas vêm sendo empregadas para avaliar danos genéticos, dentre elas, ressaltam-se o ensaio do cometa, teste de micronúcleo (MCN) e alterações nucleares por serem consideradas eficazes e sensíveis para discriminar alterações genéticas causadas por determinadas substâncias químicas (Çavas & Ergene-Gozukara, 2005a; Collins et al., 2008). Essas metodologias permitem avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade de tais substâncias em diferentes modelos animais (Çavas & Ergene-Gozukara, 2005b; Collins et al., 2008; Silva et al., 2011).

Considerando a necessidade da utilização de anestésicos em piscicultura em diversos procedimentos laboratoriais, faz-se necessária a avaliação de riscos genotóxicos e mutagênicos destes em organismos aquáticos.

2. Uso de anestésicos em pisciculturas

O uso de anestésicos facilita o manuseio dos animais, pois reduz o metabolismo durante intervenções fisiológicas e alguns procedimentos práticos no cultivo, tornando-os menos suscetíveis a doenças causadas por técnicas inadequadas de manipulação (Fabiani et al., 2013).

As práticas realizadas em pisciculturas expõem os animais ao estresse afetando a sobrevivência, crescimento e reprodução dos mesmos (Souza et al., 2012; Rodrigues, 2016). Diante disso, a anestesia se torna um procedimento importante, pois minimiza o estresse do animais e evita possíveis danos físicos ocasionados durante o manuseio (Maršić-Lucic et al., 2005).

A escolha do anestésico está relacionada com a sua eficácia na indução e na recuperação dos animais, sua disponibilidade no mercado, segurança durante o uso e seus possíveis efeitos colaterais aos peixes, seres humanos e ao meio ambiente (Marking & Meyer, 1985). Vários componentes envolvem o processo de anestesia como a sedação, imobilização, inconsciência, amnésia e analgesia. A sedação é caracterizada pela redução da sensibilidade, já a anestesia geral causa narcose, amnésia, imobilização e alívio da dor (Zahl et al., 2012). Os anestésicos agem em nível axonal, atuando ativamente e/ou bloqueando receptores nervosos específicos de acordo com o tipo de anestésico empregado (Roubach & Gomes, 2001; Ross & Ross, 2009).

O processo de anestesia em peixes pode ser dividido em seis estágios de acordo com Thurmon et al. (1996): 1) sedação leve; 2) sedação profunda; 3) perda parcial do equilíbrio; 4) perda total do equilíbrio; 5) perda da atividade reflexa; 6) interrupção dos movimentos operculares, caracterizado pelo colapso medular. Do ponto de vista econômico, a utilização de uma dose e exposição correta do anestésico é fundamental para evitar desperdícios ou a morte dos animais (Roubach & Gomes, 2001).

Os anestésicos podem ser administrados nos peixes por meio de inalação ou por via injetável (Roubach & Gomes, 2001). O método mais comum é a inalação por meio da imersão do animal em solução anestésica. A substância anestésica dispersa em água é absorvida pelas brânquias, difunde-se

para o sangue e alcança o sistema nervoso central (Ross & Ross, 2008). O efeito é avaliado pelo tempo de indução e recuperação ao anestésico, reações reflexas a estímulos externos e capacidade de resposta a manipulação (Okamura et al., 2010; Zahl et al., 2012).

Vários produtos químicos são utilizados como anestésicos para peixes, sendo os mais comuns a triclaína metanosulfato (MS-222), a quinaldina (2-4 metilquinolina), o 2-fenoxietanol (Ross & Ross, 1999; Hovda & Linley, 2000) e a benzocaína (etil 4-aminobenzoato) (Gomes et al., 2001). No entanto, algumas dessas substâncias (MS-222 e a quinaldina) são de alto custo, apresentam efeitos adversos, como irritabilidade nos animais por serem substâncias ácidas e causarem problemas na retina e irritações nas córneas dos olhos nos manuseadores, além disso a quinaldina possui potencial carcinogênico em humanos (Roubach & Gomes, 2001).

A benzocaína (Etil 4-aminobenzoato) é uma substância química lipofílica pertencente ao grupo éster, possui forma cristalina e coloração branca (Coyle et al., 2004; Ross & Ross, 2009). É um dos anestésicos mais utilizados na piscicultura, muito comum no Brasil (Oliveira et al., 2009), devido sua segurança na aplicação tanto ao homem como para os peixes, apresenta baixo custo e é relativamente fácil a sua aquisição (Inoue et al., 2003). Esse anestésico previne o estresse do animal durante o transporte devido aos seus efeitos no metabolismo (Inoue et al., 2010). As substâncias químicas usadas extensamente como anestésicos podem causar danos até irreversíveis aos peixes, como perda de muco, irritação da brânquia e lesões na córnea, quando usadas de forma inadequada ou em excesso (Inoue et al., 2003).

Deste modo, têm sido realizadas pesquisas com anestésicos de fontes naturais, visando o bem-estar do animal e de quem o manuseia (Becker et al., 2012; Silva et al., 2012). O uso de produtos naturais, como óleos essenciais derivados de plantas, tem se mostrado uma alternativa viável para anestesia em peixes (Façanha & Gomes, 2005; Cunha, 2007; Correia, 2015). Os óleos essenciais de *L. alba* (Cunha et al., 2011), mentol (Simões et al., 2009) e cravo (Roubach et al., 2005), vêm sendo amplamente utilizados nas pisciculturas como anestésicos.

O uso de extratos vegetais e os fitoterápicos é permitido para prevenção e tratamento de enfermidades dos organismos aquáticos de acordo com o Anexo I da Instrução Normativa Interministerial N° 28, de 8 de junho de 2011 (Brasil, 2011).

2.1. Óleos essenciais como anestésicos

Os óleos essenciais (OEs) podem ser obtidos a partir de diferentes partes da planta como, folha, raiz, caule e flor, mediante a destilação por arraste com vapor de água. São caracterizados por serem misturas complexas de numerosos compostos químicos, como a classe de terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Calsamiglia et al., 2007). Os metabólitos secundários encontrados nesses óleos exercem função de defesa nas plantas, frente às agressões

externas (Briskin, 2000). Os OEs são normalmente incolores ou amarelados (Figura 1), e instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Bandoni & Czepak, 2008) além disso, são biodegradáveis (Kulkarni et al., 2013).



Figura 1. Óleo essencial de *Lippia alba*. Fonte: <http://www.herbia.com.br> (2017).

A utilização de óleos essenciais tem sido amplamente difundida nos últimos anos. Estes apresentam atividades antibacteriana, antioxidante, antifúngica, analgésica, anticancerígena e inseticida (Bakkali et al., 2008; Alves, 2014). Os OEs provenientes de plantas com propriedades terapêuticas estão entre os principais produtos naturais que estão sendo estudados em peixes, por possuírem propriedades anestésicas (Lang & Buchbauer, 2012).

O uso de OEs como agentes anestésicos, vêm se tornando uma alternativa aos compostos sintéticos por serem fontes promissoras de substâncias biotivas utilizadas contra parasitos e microrganismos e apresentarem menor toxicidade (menos concentrados) e menor custo na criação de peixes, além de não serem prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivo à saúde do homem (Inoue et al., 2005; Soares & Tavares-Dias, 2013). Pesquisas recentes com óleos essenciais utilizados como anestésicos em peixes demonstraram a sua eficácia em organismos aquáticos (Souza et al., 2012; Silva et al., 2012; Rezende et al., 2017).

2.1.1. Óleo de cravo

O óleo de cravo, conhecido como Eugenol[®], foi proposto como alternativa de baixo custo para anestesia em peixes (Roubach et al., 2005; Hoshiba et al., 2015). É um composto natural, obtido a partir da destilação de folhas da planta do gênero *Eugenia* (*E. caryophyllata* e *E. aromatica*) (Cunha et al., 2010a) e tem como princípio ativo o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) sendo considerado seguro para humanos, animais e ambiente (Ross & Ross, 2008). Vários estudos avaliaram seu uso para reduzir a hipermotilidade animal, diminuindo o estresse do peixe durante o manuseio (Vidal et al.,

2008; Cunha et al., 2010a; Inoue et al., 2011). Uma vantagem do Eugenol[®] é o seu rápido metabolismo no organismo do animal, não necessitando de um tempo de depuração (ou seja, o peixe pode ser consumido poucas horas após o uso de anestesia) (Wagner et al., 2002). Esse composto é utilizado como flavorizante na indústria alimentícia e apresenta propriedades antimicóticas, antibacterianas, antifúngicas, analgésicas, antivirais e anestésicas (Hussain et al., 2000; Ross & Ross, 2008). No entanto, estudos realizados pela National Toxicology Program observaram atividades neoplásicas em ratos e camundongos expostos ao eugenol, isoeugenol e metileugenol (NTP, 1983, 2000, 2008). Nesse contexto, o Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine (FDA/CVM, 2007) não recomenda a utilização do óleo de cravo e seus constituintes como anestésicos para peixes, devido a possíveis riscos à segurança humana e animal. No entanto, este composto continua sendo utilizado em pisciculturas no Brasil (Gonçalves et al., 2008; Rezende et al., 2017).

2.1.2. Óleo essencial de *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é um subarbusto de morfologia variável (Figura 2), que pode chegar a medir até dois metros de altura, com ramos finos de coloração esbranquiçada, exibindo folhas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo (Matos, 2000). Essa espécie cresce em solos arenosos próximos a margens de rios, lagos e lagoas, mas também pode ser cultivada em solos enriquecidos em nutrientes (Oliveira et al., 2006).

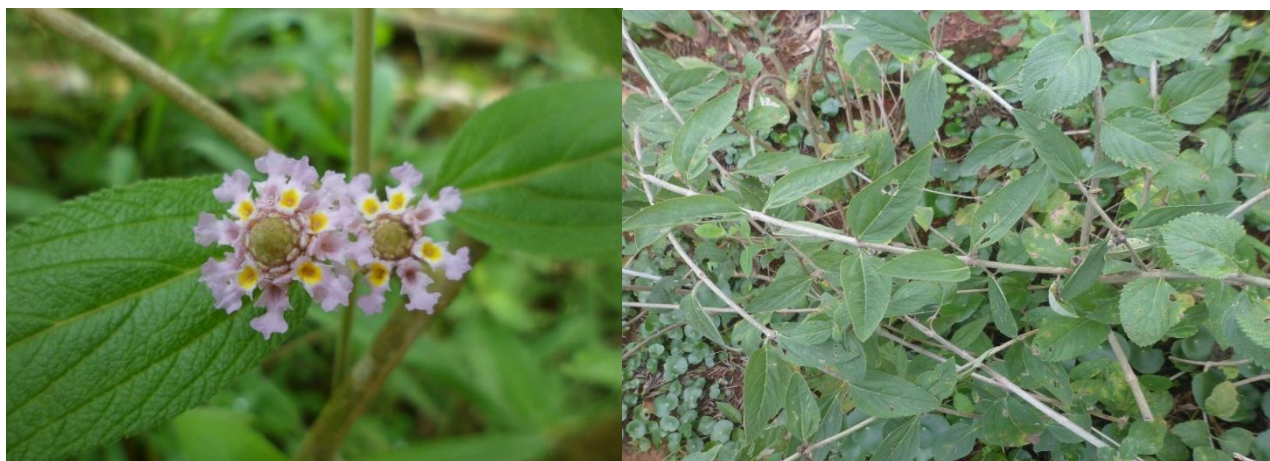


Figura 2. Imagens da espécie de planta *Lippia alba*. Fonte: Nascimento, H.S. (2017)

Os nomes populares atribuídos a essa espécie estão relacionados ao odor aromático, devido aos constituintes químicos como os terpenos (Castro et al., 2001), ou propriedades medicinais das plantas (Hennebelle et al., 2008). Os nomes mais comuns, no Brasil, são: erva-cidreira, falsa melissa, chá-de-tabuleiro, erva cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão e erva-cidreira-brava (Matos, 2000), chá-da-febre, alecrim do campo (Holetz et al., 2002) e alvia sija (Pascual et al., 2001a).

A erva-cidreira possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas Américas Central e Sul, na região sul dos Estados Unidos (Pascual et al., 2001b; Hennebelle et al., 2008), e no

Brasil é encontrada em praticamente todas as regiões (Jannuzzi et al., 2011). Essa espécie possui potencial industrial devido às facilidades agronômicas como a rusticidade, a rapidez de colonização pela propagação vegetativa, o vigor, a alogamia e, também por vegetar e florescer o ano todo, além de apresentar plasticidade fenotípica (Yamamoto, 2006).

A *L. alba* apresenta propriedades farmacológicas como ação antiespasmódica, estomáquica, antiinflamatória, antipirética, analgésica, sedativa, antibacteriana e fungicida (Franco & Barros, 2006; Mattos et al., 2007; Fabri et al., 2011). O óleo essencial que é extraído das folhas da *L. alba* possui efeito anestésico em organismos aquáticos (Cunha et al., 2010b; Azambuja et al., 2011; Veeck et al., 2013).

O óleo essencial de *L. alba* apresenta variação quantitativa e qualitativa em sua composição química (Yamamoto, 2006), influenciada pela estação do ano (Silva et al., 2006), levando à separação em quimiotipos (Hennebelle et al., 2008). Essas variações na composição do óleo e características morfológicas têm sido observadas, dependendo da origem geográfica do material biológico, o que levou à hipótese de que seriam consequência da influência de fatores ambientais (Silva et al., 2006; Yamamoto, 2006).

O OE dessa planta possui variabilidade genética em relação à composição química, sendo encontrados sete quimiotipos. Os quimiotipos encontrados baseado nos componentes químicos majoritários do OE são: quimiotipo I - citral, linalol, β -cariofileno; quimiotipo II - tagetenone; quimiotipo III - limoneno com quantidades variáveis de carvona; quimiotipo IV - mirceno; quimiotipo V - γ -terpineno; quimiotipo VI - camphor-1,8-cineol; quimiotipo VII – estragole (Hennebelle et al., 2008).

De acordo com cada quimiotipo e sua concentração é possível saber a ação farmacológica que o óleo possui. Alta concentração de limoneno-carvona (quimiotipo III), apresenta ação mucolítica (Mattos et al., 2007), enquanto plantas com alta concentração de limoneno-citral (quimiotipo I e III), apresentam ação sedativa, antiespasmódica e ansiolítica. Folhas de erva-cidreira do quimiotipo mirceno-citral (quimiotipo I e IV) são utilizadas como chás, apresentando propriedades calmantes e antiespasmódica suaves, em função do citral e analgésica devido à ação do mirceno (Vale et al., 2002). No entanto, é necessária a realização de mais pesquisas relacionadas aos quimiotipos do óleo essencial de *L. alba*.

2.2. Bioensaios para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade

Os bioensaios são ferramentas importantes para a avaliação de substâncias químicas ou naturais que podem induzir a formação de danos no material genético de muitos organismos vivos (Fernandes et al., 2009). Os efeitos genotóxicos e mutagênicos produzidos por substâncias presentes em produtos naturais, como extratos vegetais, óleos essenciais e seus derivados podem ser avaliados

mediante diversos bioensaios devido a considerável sensibilidade e confiabilidade dos resultados. Dentre os bioensaios animais destacam-se os que avaliam alterações nucleares, presença de micronúcleos (Teste de micronúcleos (MCN)) e degradação do DNA (Ensaio do cometa) (Collins et al., 2008; Leme & Marin-Morales, 2009; Athanásio et al., 2014).

Os bioensaios citogenéticos têm por finalidade analisar os principais agentes capazes de afetar em nível fisiológico e molecular de um organismo exposto. Assim, se a substância ocasionar danos ao DNA conseqüentemente há um potencial genotóxico e/ou mutagênico (Silva et al., 2003; Athanásio et al., 2014). Uma alternativa para detecção destas substâncias é o emprego de biomarcadores, que são organismos fenotipicamente sensíveis a lesões no DNA, sendo considerados indicadores que expressam de forma precisa as possíveis alterações ocasionada por esses agentes químicos, físicos e/ou biológicos em organismos vivos (Costa & Menk, 2000; Silva et al., 2011).

Atualmente, os testes citogenéticos são validados pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS), Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e pela Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para o monitoramento *in situ*, *in vivo* e *in vitro* da genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias, principalmente as provindas de fonte vegetal (Cabrera & Rodriguez, 1999; Fachinetto et al., 2007; Verri et al., 2018).

2.2.1. Mutagenicidade e Genotoxicidade

A *Mutagenicidade* é determinada pela capacidade que uma substância química possui para induzir alterações genéticas, e que, sendo fixadas, poderão ser transmitidas durante a divisão celular. O teste de micronúcleo, inicialmente desenvolvido por Boller e Schmid (1970), é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (quebra cromossômica) e aneugênicos (dano no fuso mitótico) (Neto et al., 2005). Este possibilita a detecção de efeitos mutagênicos provocados por vários agentes químicos e físicos, podendo ser utilizado para avaliação das condições ambientais (Ferreira & Nepomuceno, 2008). Além disso, é considerado um teste rápido, simples e barato para detecção de mutagenicidade (Silva & Nepomuceno, 2010).

A formação de micronúcleos (Figura 3) ocorre por meio da exposição a diferentes agentes químicos, físicos ou biológicos que ocasionam danos capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, acarretando a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos), determinando alterações mutagênicas nos cromossomos e danos ao fuso mitótico (Silva & Nepomuceno, 2010; Silva et al., 2011).

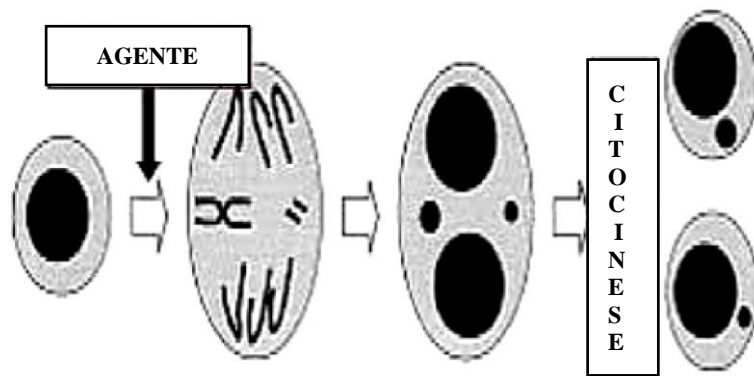


Figura 3. Divisão celular indicando a formação de micronúcleos em células eucarióticas. Fonte: Verri et al. (2018) com adaptações.

Além da formação de micronúcleos, esses agentes químicos podem ocasionar outras alterações nucleares, descritas por Carrasco et al., (1990); Viana et al., (2017) como, invaginação nuclear, núcleo lobulado, célula binucleada, picnose, brotamento nuclear, cariólise, ponte nuclear e núcleo vacuolizado (Figura 4). Essas alterações nucleares são reversíveis sendo de caracter genotóxico.

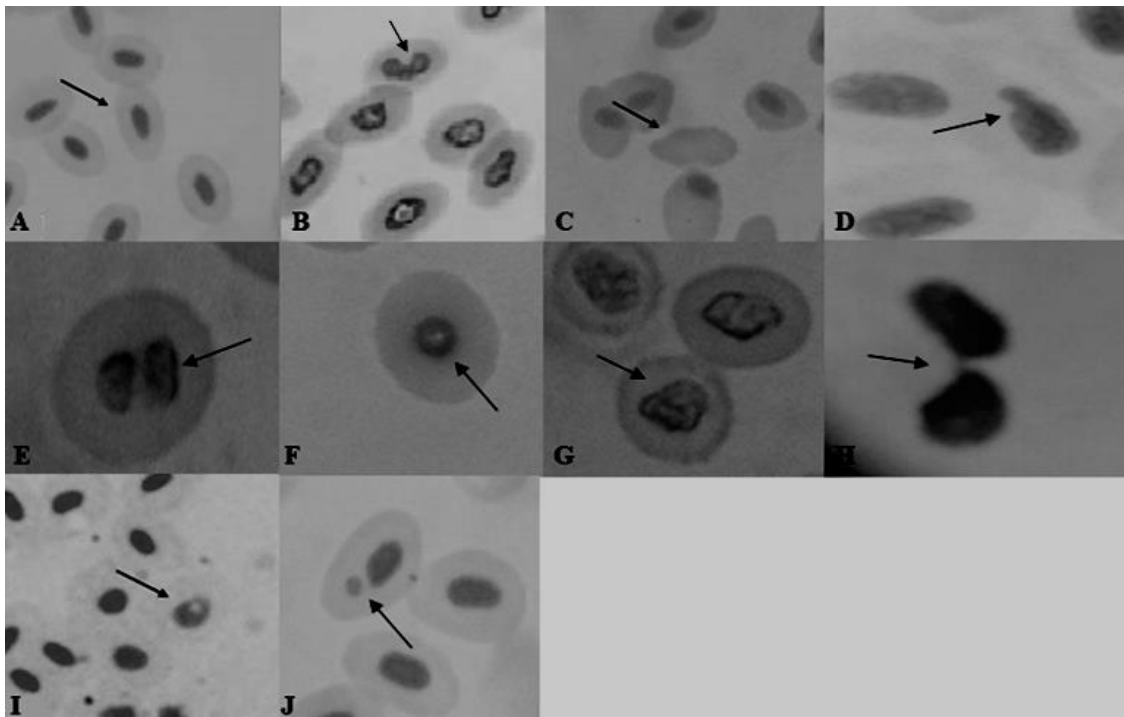


Figura 4. Micrografia ilustrando alterações nucleares em eritrócitos de peixes (espécie *O. niloticus*). Célula normal (A), invaginação nuclear (B), cariólise (C), brotamento nuclear (D), célula binucleada (E), picnose (F), núcleo lobulado (G), ponte nuclear (H), núcleo vacuolizado (I), micronúcleo (J). Fonte: Nascimento, H.S. (2017)

Baseando-se nas alterações identificadas é realizado o cálculo da frequência de micronúcleos (MCN) e o índice de genotoxicidade (IG), descrito abaixo:

$$MCN = \frac{\text{Total de Micronúcleos}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$IG = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

A *Gentoxicidade* pode ser identificada por degradação do DNA. O ensaio do cometa foi relatado pela primeira vez por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988), empregado há mais de vinte anos é uma técnica que possibilita essa identificação. É conhecida como “eletroforese em gel de célula única” (Single cell gel) (Kind et al., 2018) é um teste que permite medir e visualizar a formação de uma “cauda” em nucleóides (Collins et al., 2008). Este teste apresenta sensibilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* e versatilidade na medição de quebras de fitas simples e duplas de DNA (Collins et al., 2008). O ensaio do cometa consiste na aplicação de corrente elétrica nas células, em lâminas com gel de agarose para se observar as lesões no DNA, ocasionados por agentes genotóxicos (Di Paolo, 2006).

Nesta técnica, a corrente elétrica gera o transporte de fragmentos do DNA para fora dos núcleos em células com conteúdo nuclear lesionado (Santos et al., 2009) formando uma “cauda”. Os danos no DNA são analisados em células individuais (Brianezi et al., 2009), apresentando relação com a extensão do DNA que migrou para fora do núcleo (Fairbairn et al., 1995).

Collins et al. (1995) propuseram uma classificação visual de nucleóides baseada na migração do DNA (formação da cauda): classe 0 (nenhum dano), classe 1 (ligeiramente danificado), classe 2 (dano intermediário), classe 3 (dano elevado) e classe 4 (dano máximo). Christofolletti et al. (2009) observaram as classes 0, 1 e 2 em eritrócitos de *O. niloticus* (Figura 5).



Figura 5. Ensaio de cometa aplicado em eritrócitos de *O. niloticus* usando pH 12.1 coradas com brometo de etídio (A. Classe 0, B. Classe 1, C. Classe 2). Fonte: Christofolletti et al. (2009)

Outras classificações têm sido realizadas por *softwares* (LUCIA comet assay, Komet 5.5, Comet assay II, Comet IV) que avaliam os danos no DNA por meio de parâmetros como, momento da cauda (tail moment), momento da cabeça (olive moment), DNA da cabeça (head DNA (%)), DNA da cauda (tail DNA %), comprimento da cauda (tail length), raio da cabeça (head radius), intensidade integral (integral intensity), área da cabeça (head área) e área da cauda (tail área) (Figura 7) (Kopjar et al., 2008; Lee et al., 2009; Stang et al., 2010; Sunjog et al., 2013). Em relação as análises realizadas no software LUCIA comet assay destacam-se os parâmetros porcentagem de DNA na cauda e tamanho da cauda. No entanto, a porcentagem de DNA na cauda pode estar em maior ou menor proporção independentemente do tamanho da cauda (Figura 6).

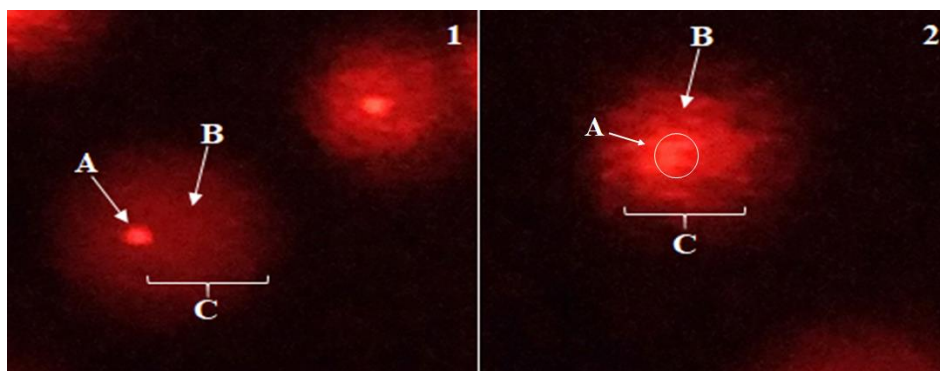


Figura 6. Ensaio do cometa, eritrócitos de peixes, *Oreochromis niloticus*, analisado pelo software LUCIA comet assay. Cabeça do cometa (A), porcentagem de DNA presente na cauda (B) e tamanho da cauda (C). Menor porcentagem de DNA na cauda (1) e maior porcentagem de DNA na cauda (2). Fonte: Nascimento, H.S. (2017)

Pesquisas utilizando ensaio do cometa indicaram sua eficiência para avaliação de genotoxicidade de diferentes compostos químicos, extratos e óleos naturais, nas diversas áreas de pesquisa: genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA, ecotoxicologia genética e biomonitoramento ambiental (Gontijo et al., 2003; Valença-Silva et al., 2014; Viana et al., 2017).

2.3. Ensaio com os peixes

O uso de peixes como modelo em pesquisas laboratoriais aumentou significativamente nas últimas décadas, sendo utilizados frequentemente como bioindicador de contaminação de corpos hídricos e modelo em ensaios laboratoriais para teste de substâncias químicas, como, por exemplo, anestésicos, medicamentos, herbicidas e fungicidas (Vicente, 2014). Testes utilizando peixes são eficientes por estes responderem aos compostos tóxicos de modo similar aos grandes vertebrados, além de serem encontrados em diferentes ecossistemas (Ramsdorf, 2009), podendo assim, serem utilizados para analisar substâncias potencialmente carcinogênicas e teratogênicas em humanos (Goulart et al., 2003).

Os peixes são sensíveis a substâncias genotóxicas e mutagênicas, e, também estão entre os maiores veículos de transferência de contaminantes para humanos (Goulart et al., 2003). Neste contexto, o Teste de micronúcleo (MCN) e o Ensaio do Cometa em peixes são considerados ferramentas importantes para avaliação de efeitos mutagênicos e genotóxicos para estudos de biomonitoramento genético (Lucero et al., 2000).

2.3.1. *Oreochromis niloticus* (Cichlidae)

Oreochromis niloticus (Figura 7) é uma espécie de peixe conhecida com Tilápia do Nilo pertencente à família Cichlidae (Çavaş & Ergene-Gözükara, 2005a). A espécie é originária da África e, foi introduzida no Brasil em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (Proença & Bittencourt,

1994). Essa espécie é tropical, apresenta temperatura ideal para o desenvolvimento variando entre 25 e 30°C e, seu crescimento afetado quando abaixo de 15°C e não resiste a temperaturas por volta de 9°C (Ono & Kubitza, 2003; Cyrino & Conte, 2006).

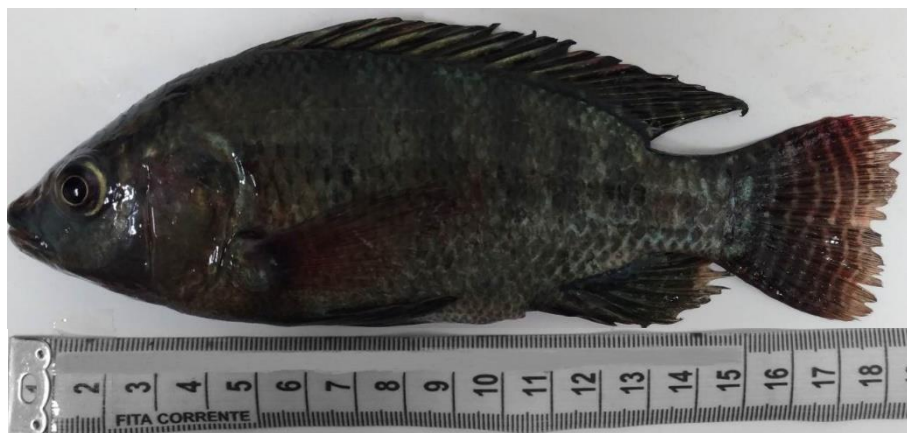


Figura 7. Imagem da espécie *Oreochromis niloticus*. Fonte: Nascimento, H.S. (2017)

A Tilápia do Nilo é um dos peixes com maior potencial para a piscicultura por apresentar características como, rápido crescimento, resistência a doenças, de hábito onívoro, respondendo com a mesma eficiência a ingestão de proteínas de origem vegetal e animal, possui capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção (Ono & Kubitza, 2003; Zimmermann & Fitzsimmons, 2004; Cyrino & Conte, 2006).

Estudos de genotoxicidade e mutagenicidade com alguns anestésicos já foram realizados com essa espécie. Barreto et al. (2007) observaram que o MS-222, utilizado como anestésico em Tilápia do Nilo, não induziu dano genotóxico ao DNA. Outro estudo realizado por Valença-Silva et al. (2014) mostrou que o propofol, também utilizado como anestésico, não ocasionou danos genotóxicos e mutagênicos no DNA nessa espécie (Valença-Silva et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando o desenvolvimento das pisciculturas no Brasil e o aumento nas culturas de diversas espécies de peixes, cresce a necessidade da utilização de agentes anestésicos para o manuseio desses animais. Os anestésicos auxiliam durante o manejo dos peixes evitando danos físicos. No entanto, estudos que avaliem alterações genéticas ocasionadas por substâncias anestésicas em peixes são escassos.

Neste contexto, torna-se necessária a realização de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade para avaliar os possíveis danos genéticos que os anestésicos comerciais ou naturais possam ocasionar nas células dos peixes.

4. REFERÊNCIAS

- AZAMBUJA, C. R. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, n. 1, p.156-161, 2011
- ALMEIDA, P. O. S. **Atividade citotóxica do óleo essencial de *Lippia* spp. frente a células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano.** 2016. 41p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2016. Disponível: < <https://www.ri.ufs.br/handle/riufs/6779>>. Acesso em 28 de fev. 2018.
- ALVES, F. C. B. **Ação antibacteriana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários.** 2014. 63p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e aplicada), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108870>>. Acesso em 28 de fev. 2018.
- ATHANÁSIO, C. G.; PRÁ, D.; RIEGER, A. Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 7, 2014.
- AZAMBUJA, C. R. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, n. 1, p. 156-161, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n.2, p. 446-475, 2008.
- BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: Aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. **Vitória: EDUFES**, p. 623, 2008.
- BARRETO, R. E. et al. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 163-168, 2007.
- BECKER, A. G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, ins water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 789-796, 2012.
- BOLLER, K; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals-Chinese hamster cells as an in vivo test system. Haematological finding after treatment with trenimon. **Humangenetik.**, v. 11, p. 34-54, 1970.
- BRASIL. Instrução normativa interministerial Nº 28, de 8 de junho de 2011. **Estabelece normas técnicas para os sistemas orgânicos de produção aquícola a serem seguidos por toda pessoa física ou jurídica responsável por unidades de produção em conversão ou por sistemas orgânicos de produção.** Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-interministerial-no-28-de-08-de-junho-de-2011-producao-de-organismos-aquaticos.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2017.
- BRIANEZI, G. S; CAMARGO, J. L. V; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.
- BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant physiology**, v. 124, n. 2, p. 507-514, 2000.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CASTRO, H. G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2.ed. **Visconde do Rio Branco: UFV-MG: Editora Suprema**, p. 113, 2001.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 155–8, 2009.

COLLINS, A. R.; MA, A. G.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

CORREIA, A. M. **Uso dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia* e *Ocimum basilicum* como anestésicos e analgésicos em peixes-palhaços *Amphiprion clarkii***. 2015. 61p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/158403>>. Acesso em 28 de fev. 2018.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, p. 24-26, 2000.

COYLE, S. D. et al. Evaluation of growth, feed utilization, and economics of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, fed diets containing different protein sources in combination with distillers dried grains with solubles. **Aquaculture research**, v. 35, n. 4, p. 365-370, 2004.

CUNHA, M. A. **Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas**. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado em zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/ppgz/conteudo/Defesas/Dissertacoes/Mauro_Alves_da_Cunha.pdf> Acesso em: 07 de ago. 2017.

CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107-2114, 2010a.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1, p. 403-406, 2010b.

CUNHA, M. A. et al. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 683-688, 2011.

CYRINO, J. E.; CONTE, L. 2006. Tilapicultura em gaiolas: produção e economia. In: CYRINO, E. P. e URBINATI, E. C. (Eds.). **AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e**

Aquicultura. **Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, cap.12, p.151-171.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine Orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 107-111, 2005a.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005b.

DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio cometa a estudos de dano ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos a B-naftotaxona**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de oceanografia biológica) – Instituto Oceanógrafo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FABIANI, B. M. et al. Benzocaína e eugenol como anestésicos para piraputanga (*Brycon hilarii*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 35, n. 2, p. 113-117, 2013.

FAIRBAIRN, D. W; OLIVE, P. L; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidante and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 840-846, 2011.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, p. 71-75, 2005.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, G. R.; NEPOMUCENO, J. C. Poluição do Rio Santa Catarina no Município de Vazante (MG) detectada por meio do Teste do Micronúcleo em Peixes. **Perquirere**, 5. ed., v. 5, n. 1, p. 155-160, 2008.

Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine - FDA/CVM. Guidance for industry: concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish. Rockville. 3p., 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052520.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D' água dos Pires, Esperantina Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 3, p. 68-88, 2006.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 1, p. 153-164, 2003.

- GOMES, L. C. et al. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001.
- GONTIJO, A. M. M. C. et al. Comet Assay: Detection of DNA damage and DNA repair in individual cells. **Mutagênese Ambiental. ULBRA Inc, Canoas**, p. 247-275, 2003.
- GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 3, 2008.
- HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- HOSHIBA, M. A. et al. Clove oil and menthol as anesthetic for platy. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n.1, p. 737-742, 2015.
- HOVDA, J.; LINLEY, T. J. The potential application of hypothermia for anesthesia in adult Pacific salmon. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 67-72, 2000.
- HUSSAIN, M. M. A. et al. Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 12, n. 3, p. 224-229, 2000.
- INOUE, L. A. K. A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- INOUE, L. A. K. A. et al. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p. 289-295, 2005.
- INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 3, p. 909-918, 2010.
- INOUE, L. A. K. A. et al. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 327-332, 2011.
- JANNUZZI, H. et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.
- JÚNIOR, M. B. et al. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis de *Pimelodus britskii* (mandi-pintado). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 134-138, 2014.
- KIND, B. et al. Single Cell Gel Electrophoresis for the Detection of Genomic Ribonucleotides. In: Muzi-Falconi M., Brown G. **In: Genome Instability. Methods in Molecular Biology**, Humana Press, New York, NY, vol. 1672, p. 311-318, 2018.
- KOPJAR, N. et al. Assessment of DNA integrity in erythrocytes of *Cobitis elongata* affected by water pollution: the alkaline comet assay study. **Folia Zoologica**, v. 57, n. 1/2, p. 120, 2008.

KULKARNI, R. R. et al. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Pest Science**. v. 86, n. 4, p.713-718, 2013.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.

LEE, S. W.; KIM, S. M.; CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 86-91, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LUCERO, L. et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 464, n. 2, p. 255-262, 2000.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better fish anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, Bethesda, v. 10, n. 6, 1985.

MARŠIĆ-LUCIĆ, J.; MLADINEO, I.; TUDOR, M. Comparative effectiveness of 2phenoxyethanol and propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 13, n. 6, p. 543-553, 2005.

MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. **Fortaleza: Imprensa Universitária**, 346 p., 2000.

MATTOS, S. H. et al. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63. (série BNB - ciência e tecnologia 2).

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – NTP. 1983 *Toxicology and carcinogenesis studies of eugenol in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed studies)*. 420p. (NTP. Technical Report Series, 223).

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – NTP. 2000 *Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies)*. 420p. (NTP. Technical Report Series, 491).

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM - NTP. 2008 *Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS NO. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies)*. 208p. (NTP. Technical Report Series, 551).

NETO, J. X. A. et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*, **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273 - 278, 2007.

- OKAMURA, D. et al. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 971-976, 2010.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.108, n. 1, p.103–108, 2006.
- OLIVEIRA, J. R. et al. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1163-1169, 2009.
- ONO, A. E.; KUBITZA, F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3. ed, **Jundiaí: Agua & Imagem**, 2003. 126p.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.
- PARODI, T. V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)** v. 155, n. 3, p. 462-468, 2012.
- PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Il Fármaco**, v. 56, n. 5, p. 501-504, 2001a.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n. 3, p.201-214, 2001b.
- PIMENTA, P. P. P.; FRANÇA, I. A viabilidade da piscicultura para o pequeno produtor de Dourados. **Comunicação & Mercado**, v. 1, n. 1, p. 36, 2012.
- PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. Ibama, 1994.
- RAMSDORF, W. A. et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.
- REZENDE, F. P. et al. Sedation of Nile tilapia with essential oils: tea tree, clove, eucalyptus, and mint oils. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 2, p. 479-486, 2017.
- ROCHA, M. A. et al. Determination of the optimal dose of benzocaine hydrochloride in anesthesia of tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2403-2410, 2012.
- RODRIGUES, T. T. E. **Piscicultura e assistência técnica na Amazônia Ocidental**. 2016. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016. Disponível em: <<http://bdt.d.ufam.edu.br/handle/tede/5511>>. Acesso em 28 de fev. 2018.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Oxford: Blackwell Science**. 159p., 1999.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. **Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK**, 2008.

- ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. **Blackwell, London, UK**. 222P., 2009.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, 2001.
- ROUBACH, R. et al. Eugenol as a efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.
- SANTOS, D. B. et al. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v. 681, p. 3-12, 2009.
- SANCHEZ-GALAN, S. et al. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 412, n. 3, p. 219-225, 1998.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Genética toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**, p. 422, 2003.
- SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.52-55, 2006.
- SILVA, A. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere**, Patos de Minas: UNIPAM, v. 7, n. 1, p. 167-179, 2010.
- SILVA, R. R. P; PIRES, O. R; GRISOLIA, C. K. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. **Toxicon**, v. 58, n. 3, p. 259-264, 2011.
- SILVA, L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L: anesthetic effect, mechanism of action and tolerance in silver catfish. *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.
- SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.
- SIMÕES, L. N.; GOMES, L. C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 613-620, 2009.
- SINGH, N. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, n. 175, p. 184-199, 1988.
- SOUZA, R. A. R.; CARVALHO, C. V. A.; FLORES, F. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, p. 247-255, 2012.
- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**. v. 3, n. 1, p.109-123, 2013.
- SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, n.1, p. 107-114, 2016.

- SUNJOG, K. et al. Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 14, p. 4879-4885, 2013.
- STANG, A. et al. Automated analysis of DNA damage in the high-throughput version of the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 698, n. 1, p. 1-5, 2010.
- TORRES, S. M. et al. Análise da eficiência da produção da piscicultura na região de Dourados-MS. **Análise**, v. 38, n. 52, p. 1-16, 2017.
- THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. Anesthesia of wild, exotic and laboratory animals. **Lumb and Jones, veterinary anesthesia**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 686-735, 1996.
- VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709-714, 2002.
- VALENÇA-SILVA, G. et al. Low dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile Tilapia. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 143, n. 2, p. 414-419, 2014.
- VEECK, A. P. L. et al. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 955-960, 2013.
- VENTURA, A. S. **Óleos essenciais de *Lippia alba* e *Lippia sidoides* e seus efeitos fisiológicos em *Piaractus mesopotamicus***. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2016.
- VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 1, 2018.
- VIANA, L. F. et al. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-8, 2017.
- VICENTE, A. L. **Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.
- VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a Tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, n. 1, p. 353-366, 2002.
- YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo – Universidade de São Paulo, Campinas, 2006.
- ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia oh farmed fisch: implications for welfare. **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 201-218, 2012.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensive. In: José Eurico Posseibon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Débora Machado Fracalosi, Newton Castagnolli (Editores), Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva, São Paulo: TecArt, Cap.9, p. 239-266, 2004.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial de *Lippia alba* e compará-lo com os anestésicos comerciais utilizados no manejo de *Oreochromis niloticus*.

5.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se o tamanho e peso corporal dos peixes influenciam na quantidade de alterações encontradas no DNA;
- Analisar se o tempo (24, 48 e 72h) após a exposição ao anestésico está relacionado à frequência de alterações genéticas;
- Avaliar se os anestésicos comerciais apresentam diferenças genotóxicas e mutagênicas em relação ao óleo essencial de *Lippia alba*.

6. HIPÓTESE

O óleo essencial de *Lippia alba* por ser um composto natural apresenta menor genotoxicidade e mutagencidade que os anestésicos comerciais Benzocaína[®] e Eugenol[®].

CAPÍTULO II

Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de anestésicos em *Oreochromis niloticus*

Artigo em elaboração a ser submetido:

Transactions of the American Fisheries Society

Fator de impacto: 1.502

1 **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de anestésicos em *Oreochromis niloticus***

2 **Running head:** Genotoxicidade de anestésicos *O. niloticus*

3

4 Héllina S. Nascimento^a, Bruno A. Crispim^a, Luiza F. V. Francisco^a, Felipe M. Merey^a, Arlene S.
5 Ventura^b, Lucilene F. Viana^b, Luís A. K. A. Inoue^c, Alexeia B. Grisolia^a

6 ^aLaboratório de Mutagênese Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia
7 Dourados – Itahum, Km 12 – Cidade Universitária, Dourados - MS, Brasil.

8 ^bPrograma de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PGRN), Universidade Estadual de Mato
9 Grosso do Sul (UEMS), Rodovia Dourados – Itahum, Km 12 – Cidade Universitária, Dourados -
10 MS, Brasil.

11 ^cLaboratório de Piscicultura, Embrapa Agropecuária Oeste, Rodovia BR 163, Km 253,6, Dourados
12 - MS, Brasil.

13 **RESUMO**

14 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito mutagênico e genotóxico do óleo essencial de *Lippia*
15 *alba* e comparar seus efeitos com anestésicos comerciais utilizados em *Oreochromis niloticus* nas
16 pisciculturas. Para tanto, os peixes, foram expostos a três anestésicos (Benzocaína[®], Eugenol[®] e
17 óleo essencial de *L. alba*), onde foi observado o tempo de indução e recuperação ao anestésico e
18 posteriormente avaliados danos mutagênicos e genotóxicos em eritrócitos pisceos. Os dados
19 biométricos dos peixes foram coletados para verificar se estes influenciam na quantidade de
20 alterações genéticas encontradas no DNA. Os danos genéticos foram avaliados utilizando o ensaio
21 do cometa, teste de micronúcleo e alterações nucleares em eritrócitos. Os resultados demonstraram
22 que o Eugenol[®] induziu os peixes a anestesia antes de 5 min e a recuperação de equilíbrio e natação
23 normal não ultrapassou esse tempo. Os anestésicos Benzocaína[®] e OE de *L. alba*, induziram os
24 peixes a anestesia em 10 min e o tempo de recuperação foi menor que 5 min. O tamanho e peso
25 corporal (*O. niloticus*) não influenciaram nas alterações genéticas encontradas no DNA. Os

26 anestésicos apresentaram genotoxicidade em todos os tempos analisados. Porém a Benzocaína[®] e
27 Eugenol[®] apresentaram maior genotoxicidade em 72 h, e OE *L. alba* nesse período apresentou
28 redução significativa de genotoxicidade, indicando que o tempo de depuração dos anestésicos pode
29 influenciar na genotoxicidade. Apenas os anestésicos Eugenol[®] e Benzocaína[®] ocasionaram
30 mutagenicidade. Diante disso, pode-se concluir que o óleo essencial de *L. alba* torna-se alternativa
31 viável aos compostos químicos convencionais, além de apresentar efeito genotóxico menor quando
32 comparado aos demais anestésicos e não possuir efeito mutagênico.

33 **INTRODUÇÃO**

34 Os procedimentos realizados nas pisciculturas como, transporte, marcação, biometria, e
35 análise patológica (Maršic-Lucic et al. 2005), expõem os peixes a uma variedade de estressores, que
36 podem afetar a sobrevivência, crescimento e reprodução desses animais (Souza et al. 2012). O uso
37 de agentes anestésicos durante esses procedimentos facilita o manuseio dos peixes, pois reduz o
38 estresse e evita possíveis danos, como a perda de escamas ou lesões que ocasionam a entrada de
39 patógenos (Maršic-Lucic et al. 2005). Os anestésicos são usados para diminuir o metabolismo do
40 animal durante intervenções gerais e alguns procedimentos práticos de manejo, tornando-os menos
41 suscetíveis a doenças causadas por técnicas inadequadas de manipulação (Fabiani et al. 2013).

42 O anestésico utilizado para tal prática deve ser selecionado, de acordo com a sua eficácia
43 na indução de anestesia e na recuperação dos animais, sua disponibilidade no mercado, efeito
44 residual, segurança durante o uso e possíveis efeitos colaterais aos peixes, seres humanos e ao meio
45 ambiente (Marking e Meyer 1985). Diversos produtos químicos são utilizados como anestésicos
46 para peixes, sendo a benzocaína (etil 4-aminobenzoato) o anestésico mais comum utilizado no
47 Brasil (Gomes et al. 2001; Oliveira et al. 2009). Também pode-se destacar o uso de substâncias
48 químicas como, quinaldina e tricaína metanosulfato (MS-222), no entanto esses anestésicos podem
49 ocasionar efeitos adversos nos animais, como, perda de muco, irritação da brânquia, lesões na
50 córnea (Inoue et al. 2010).

51 Pesquisas com anestésicos provenientes de fontes naturais vêm sendo realizadas (Becker et
52 al. 2012; Silva et al. 2012; Rezende et al. 2017). O uso de óleos essenciais como agentes
53 anestésicos, constitui forma alternativa em relação ao uso dos compostos sintéticos. Estes são fontes
54 promissoras de substâncias biotivas utilizadas contra parasitos e microrganismos e apresentam
55 menor toxicidade por serem menos concentrados e menos onerosos na criação de peixes, não sendo
56 prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem (Inoue et al. 2005; Soares e
57 Tavares-Dias 2013).

58 O óleo essencial (OE) da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, conhecida popularmente como
59 erva-cidreira, tem sido utilizado na medicina popular, devido as propriedades terapêuticas. Estudos
60 *in vivo* e *in vitro* demonstraram o potencial bioativo do óleo. O OE e extratos desta espécie foram
61 capazes de inibir crescimento de bactérias, fungos e protozoários (Nogueira et al. 2007; Escobar et
62 al. 2010; Fabri et al. 2011), além de ocasionar efeito anestésico em organismos aquáticos (Parodi et
63 al. 2012; Becker et al. 2012; Veeck et al. 2013).

64 Como os anestésicos são utilizados em pisciculturas e em procedimentos laboratoriais, faz-
65 se necessário avaliar a existência de riscos mutagênicos e genotóxicos para organismos aquáticos
66 como peixes. Testes utilizando peixes como modelo experimental indicaram resposta similar dos
67 diversos compostos químicos em grandes vertebrados, além destes serem encontrados facilmente
68 nos ecossistemas (Ramsdorf et al. 2009).

69 A espécie de peixe ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade necessita ser
70 encontrada facilmente em diversos ecossistemas aquáticos, sensível para detectar poluentes e
71 substâncias químicas em baixas concentrações e de fácil manuseio no laboratório (Sanchez-Galan
72 1998; Ramsdorf et al. 2009). A espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida como Tilápia do Nilo
73 destaca-se por apresentar as condições anteriormente mencionadas, se tornando ideal para tais
74 estudos (Barreto et al. 2007; Valença-Silva et al. 2014). Além disso, essa espécie é muito comum no
75 Brasil e amplamente comercializada em pisciculturas em diversas regiões.

76 Diversas técnicas vêm sendo empregadas para avaliar danos genéticos, dentre elas,
77 destacam-se o ensaio do cometa, teste de micronúcleo (MCN) e alterações nucleares por serem
78 consideradas eficazes e sensíveis para revelarem alterações genéticas causadas por determinadas
79 substâncias químicas (Çavas e Ergene-Gozukara 2005a; Collins et al. 2008). Estas possibilitam a
80 detecção da genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias em diferentes modelos animais (Çavas
81 e Ergene-Gozukara 2005b; Collins et al. 2008; Silva et al. 2011).

82 Considerando a expansão das pisciculturas no Brasil e a crescente necessidade da
83 utilização de anestésicos para o manuseio dos animais, torna-se relevante a realização de pesquisas
84 que avaliem aspectos relativos à genotoxicidade e mutagenicidade para investigação de possíveis
85 danos genéticos que os anestésicos comerciais ou naturais possam causar no DNA. Neste contexto,
86 objetivou-se avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial de *L. alba* em diferentes
87 tempos, comparar esses efeitos com outros anestésicos comumente utilizados no manejo de *O.*
88 *niloticus*.

89 **MÉTODOS**

90 **Material vegetal e produção de Oleo Essencial de *Lipia alba***

91 A espécie *L. alba* foi cultivada em campo experimental da Divisão Amazônia Ocidental da
92 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em Manaus. As partes aéreas das
93 plantas foram cortadas e secas ao ar. Uma exsicata foi depositada no herbário da Embrapa
94 Amazônia Ocidental, sob o registro nº 002\2008 processo 02001.002726\2013-25 (Ventura 2016).

95 O óleo essencial bruto de *L. alba* foi obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo
96 Clevenger. Foram colocadas 100 gramas das partes aéreas (flores, folha e caule) em balões
97 volumétricos e adicionados 2000 ml de água destilada e submetidos ao processo de extração. O
98 rendimento do óleo essencial foi de 1,7% (m/v). A análise cromatográfica identificou 35 compostos
99 neste OE de *L. alba*, sendo os componentes majoritários, a carvona (52,54%), limoneno (17,25%),
100 β -copaeno (4,29%), (E)-cariofileno (3,31%), mirceno (3,02%) e β -atlantona (2,51%) (Ventura
101 2016).

102 **Peixes e condições gerais**

103 Cento e trinta juvenis de Tilápias do Nilo de tamanho $15,0 \pm 1,4$ cm (média \pm DP) e peso
104 $59,5 \pm 18,0$ g (média \pm DP) provenientes de um mesmo lote e mantidas em tanques de 1000 litros
105 de água em sistema de recirculação no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste,
106 Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul (Brasil) foram utilizadas para o experimento. A
107 temperatura da água nos tanques variou de $25^{\circ}\text{C} \pm 26^{\circ}\text{C}$ (monitorada duas vezes ao dia) e os animais
108 foram alimentados, duas vezes ao dia, com *pellets* seco comercial (teor de proteína de 32%) de
109 acordo com a ABNT (2011).

110 Os procedimentos para a realização deste estudo foram realizados em conformidade com a
111 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) da Universidade Federal da Grande
112 Dourados, registrado sob o protocolo de nº 27/2017.

113 **Preparo dos anestésicos**

114 Três compostos foram avaliados, sendo dois comerciais, Eugenol[®] e Benzocaína[®] (ambos
115 na concentração de 60 mg/L) e outro natural, o óleo essencial (OE) de *L. alba* (150 mg/L).
116 Considerando a baixa solubilidade dos óleos essenciais estes foram dissolvidos em álcool etílico na
117 concentração final de 0,6%, assim como os anestésicos comerciais. As concentrações das soluções
118 anestésicas foram baseadas em parâmetros estabelecidos por Ventura (2016) e Medeiros-Silva et al.
119 (2014).

120 **Efeito anestésico (teste de indução e recuperação)**

121 Os peixes (n=5) (*O. niloticus*) foram transferidos para aquários (mantido a 25°C) com
122 soluções anestésicas diluídas nas respectivas concentrações de 60 mg/L para Eugenol[®] e
123 Benzocaína[®], e 150 mg/L para OE de *L. alba*. O efeito anestésico foi mensurado por meio de
124 registro do tempo de um peixe perder o equilíbrio e não reagir à estimulação física. A perda total de
125 equilíbrio é equivalente ao estágio 4 da anestesia (Thurmon et al. 1996). Depois da exposição dos
126 peixes aos anestésicos, estes foram isolados em um aquário de 10L com água (sem solução

127 anestésica), onde foi analisado o tempo de recuperação do efeito do anestésico, caracterizado pelo
128 retorno dos movimentos e equilíbrio natatório normal.

129 **Procedimento experimental**

130 Para o experimento foram utilizados 20 peixes por tratamento (6 tratamentos). Os animais
131 ficaram 24h em jejum antes do início do experimento. Seis aquários foram utilizados com os
132 seguintes tratamentos (1) Controle negativo (CN) somente água, (2) Controle veículo (CV) álcool
133 0,6%, (3) Controle Positivo (CP) ciclofosfamida, (4) óleo essencial de *L. alba* (LA), (5)
134 Benzocaína® (BZ) e (6) Eugenol® (EG). Após a água ser homogeneizada com os anestésicos
135 diluídos, os peixes foram expostos ao manejo de captura e alocados nos aquários para o banho com
136 os anestésicos por 10 min. Posteriormente, os animais foram acondicionados em outros aquários,
137 com água sem solução anestésica. A Ciclofosfamida (40 mg/kg) utilizada como controle positivo
138 foi injetada intraperitonealmente.

139 As coletas sanguíneas destinadas aos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade foram
140 realizadas em 5 peixes por tratamento após 24, 48 e 72h após a exposição aos anestésicos. Após 24h
141 da 5 peixes foram retirados dos aquários de cada tratamento e realizou-se a coleta de sangue (por
142 meio de punção da veia caudal) e biometria. Os dados biométricos foram anotados após a coleta
143 sanguínea. Após essa etapa, os peixes foram colocados em outro aquário com água livre de solução.
144 O mesmo procedimento foi repetido após as 48 e 72 h.

145 **Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade**

146 ***Ensaio do cometa***

147 O ensaio do cometa foi realizado seguindo a metodologia proposta por Ventura (2004)
148 com adaptações. Para tanto foram coletados 6µL de sangue por peixe e diluídos em 500 µL de
149 solução Tampão PBS (tampão fosfato salino). As lâminas foram confeccionadas em duplicata para
150 cada peixe e cada lâmina foi montada com 40 µL de suspensão celular e 140 µL de agarose de
151 baixo ponto de fusão 0,5% (v/v) a 37°C.

152 As lâminas permaneceram em solução de lise por 2h e em seguida em solução tampão
153 NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos para desnaturação do DNA.
154 Posteriormente foram submetidas à eletroforese a 37 V, 300 mA, por 25 minutos. As lâminas foram
155 neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹, fixadas em etanol PA e armazenadas em geladeira até o
156 momento das contagens.

157 As lâminas foram coradas com 30 µL brometo de etídeo (1,6 mg/mL) e 100 nucleoides por
158 lâmina foram observados em microscópio de fluorescência (LABMED, Lx 400) na objetiva de 40x,
159 posteriormente fotografados e analisados no software LUCIA comet assay utilizando os seguintes
160 parâmetros, tail length (tamanho da cauda) e tail DNA % (porcentagem de DNA na cauda).

161 ***Teste de Micronúcleo e alterações nucleares***

162 O teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares seguiu o protocolo descrito por
163 Schmid (1975) e Heddle et al. (1983) com adaptações. Após cada período de exposição, as lâminas
164 com esfregaço sanguíneo dos eritrócitos para contagem de micronúcleos e alterações morfológicas
165 nucleares, foram preparadas em duplicata, contendo uma gota de sangue coletado de cinco peixes
166 por tratamento. Posteriormente, as lâminas foram secas, fixadas em etanol PA e hidrolisadas em
167 HCl 1N à 60°C por 10 minutos. A coloração foi realizada utilizando o corante reativo de *schiff* e
168 contra corante *fast green*. A contagem dos micronúcleos e alterações nucleares foi realizada em
169 microscópio óptico Nikon (Eclipse, E200), no aumento de 1000X. De cada peixe foram contadas
170 2.000 células para o cálculo da frequência de micronúcleos (MCN) e índice de genotoxicidade (IG).

171 Para calcular a frequência de micronúcleos (MCN) e o índice de genotoxicidade (IG)
172 foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$173 \quad \text{MCN} = \frac{\text{Total de Micronúcleos}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

$$174 \quad \text{IG} = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

175

176 No índice de genotoxicidade foram observadas as seguintes alterações nos eritrócitos:
177 invaginação nuclear, brotamento nuclear, núcleo vacuolizado, célula binucleada, núcleo lobulado e
178 picnose (Carrasco et al. 1990; Viana et al. 2017).

179 **Análise estatística**

180 Para verificar se o peso e o tamanho influenciaram nos efeitos mutagênicos e genotóxicos foi
181 realizado ANCOVA ($\alpha=0,05$). Para comparação dos ensaios de genotoxicidade através do teste do
182 cometa foi aplicado o teste paramétrico análise de variância (ANOVA) e um teste *a posteriori de*
183 *Tukey* ($\alpha=0,05$) e para a comparação do ensaio de mutagenicidade e genotoxicidade através do teste
184 de micronúcleo e alterações nucleares foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com
185 *a posteriori de Dunn* ($\alpha=0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando a plataforma R (R
186 Core Team, 2016).

187 **RESULTADOS**

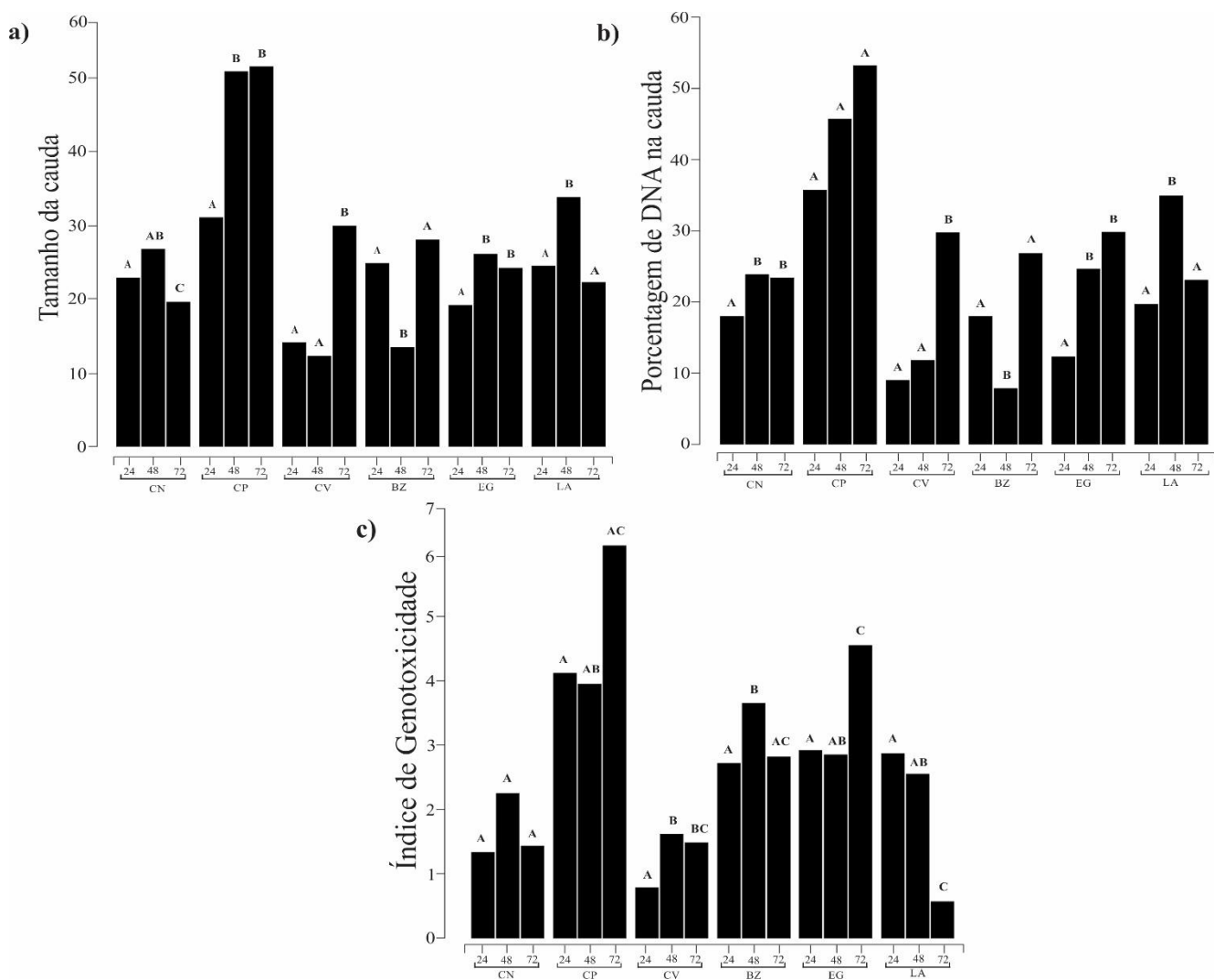
188 Os resultados referentes ao teste de indução à anestesia em soluções com os diferentes
189 anestésicos (Benzocaína[®], Eugenol[®] e OE de *L. alba*) foram demonstrados na Tabela 1. Os peixes
190 submetidos a imersão revelaram perda total de equilíbrio e não resposta à estimulação. A
191 recuperação de equilíbrio e natação normal foi mais rápida no anestésico OE de *L. alba*.

Tabela 1. — Tempo de indução e recuperação aos diferentes anestésicos em *Oreochromis niloticus*.

| Anestésicos | Perda total do equilíbrio | Recuperação parcial do equilíbrio | Natação normal |
|-------------------------------------|----------------------------------|--|-----------------------|
| Benzocaína [®] (60 mg/L) | 10 min | 2 min 7s | 3 min |
| Eugenol [®] (60 mg/L) | 3 min | 2 min | 4 min |
| OE de <i>Lippia alba</i> (150 mg/L) | 10 min | 50s | 2 min |

192 Com base nos resultados da ANCOVA é possível verificar que o tamanho e peso corporal
193 (*O. niloticus*) não influenciaram nas alterações genéticas encontradas no DNA ($p>0,05$).

194 A genotoxicidade analisada por meio do ensaio do cometa revelou que quando comparado
195 o tamanho da cauda nos tempos (24, 48 e 72h) dentro de cada tratamento foi possível verificar que
196 houve aumento significativo ($p<0,05$) em 48h para os tratamentos CN, CP, LA e EG. Nos
197 tratamentos CV e BZ esse aumento somente foi possível verificar em 72h (Figura 1a).



198

199 **Figura 1.** — Comparação entre os períodos de 24, 48 e 72h em cada tratamento com os compostos
 200 anestésicos na espécie *Oreochromis niloticus* para tamanho da cauda (a), porcentagem de DNA na
 201 cauda (b) (parâmetros do ensaio do cometa) e índice de genotoxicidade baseado em alterações
 202 nucleares (c).

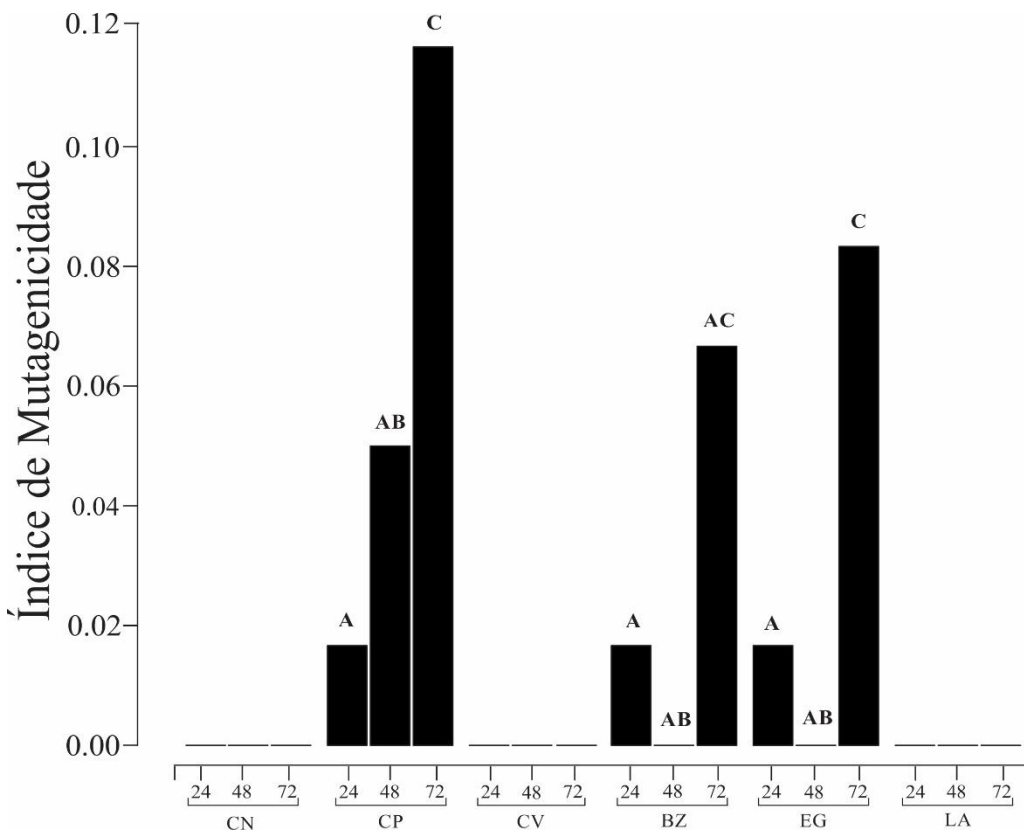
203 (CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; CV- Controle Veículo; BZ- Benzocaína (60 mg/L);
 204 EG- Eugenol (60 mg/L); LA- óleo essencial de *Lippia alba* (150 mg/L)).

205 Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os períodos dentro de
 206 cada tratamento.

207 Para porcentagem de DNA presente na cauda nos tratamentos CN, LA, EG e CP houve um
 208 aumento significativo ($p < 0,05$) em 48h. Para o tratamento BZ nesse parâmetro foi observado
 209 aumento significativo em 72h (Figura 1b).

210 Para o índice de genotoxicidade analisado com base em resultados referentes a alterações
211 nucleares foi possível verificar que no tratamento LA o índice de genotoxicidade foi maior em 24h
212 apresentando uma diminuição significativa no tempo de 72h. Os tratamentos CN, CV e BZ
213 apresentaram aumento significativo para esse índice a partir de 48h. Nos tratamentos CP e EG, o
214 aumento significativo deste índice somente ocorreu em 72h (Figura 1c).

215 Para o índice de mutagenicidade observou-se que não houve presença de micronúcleos
216 em nenhum dos tempos nos tratamentos CN, CV e LA ($p>0,05$). Nos tratamentos BZ, EG e CP o
217 índice mutagênico foi maior no período de 72h (Figura 2).

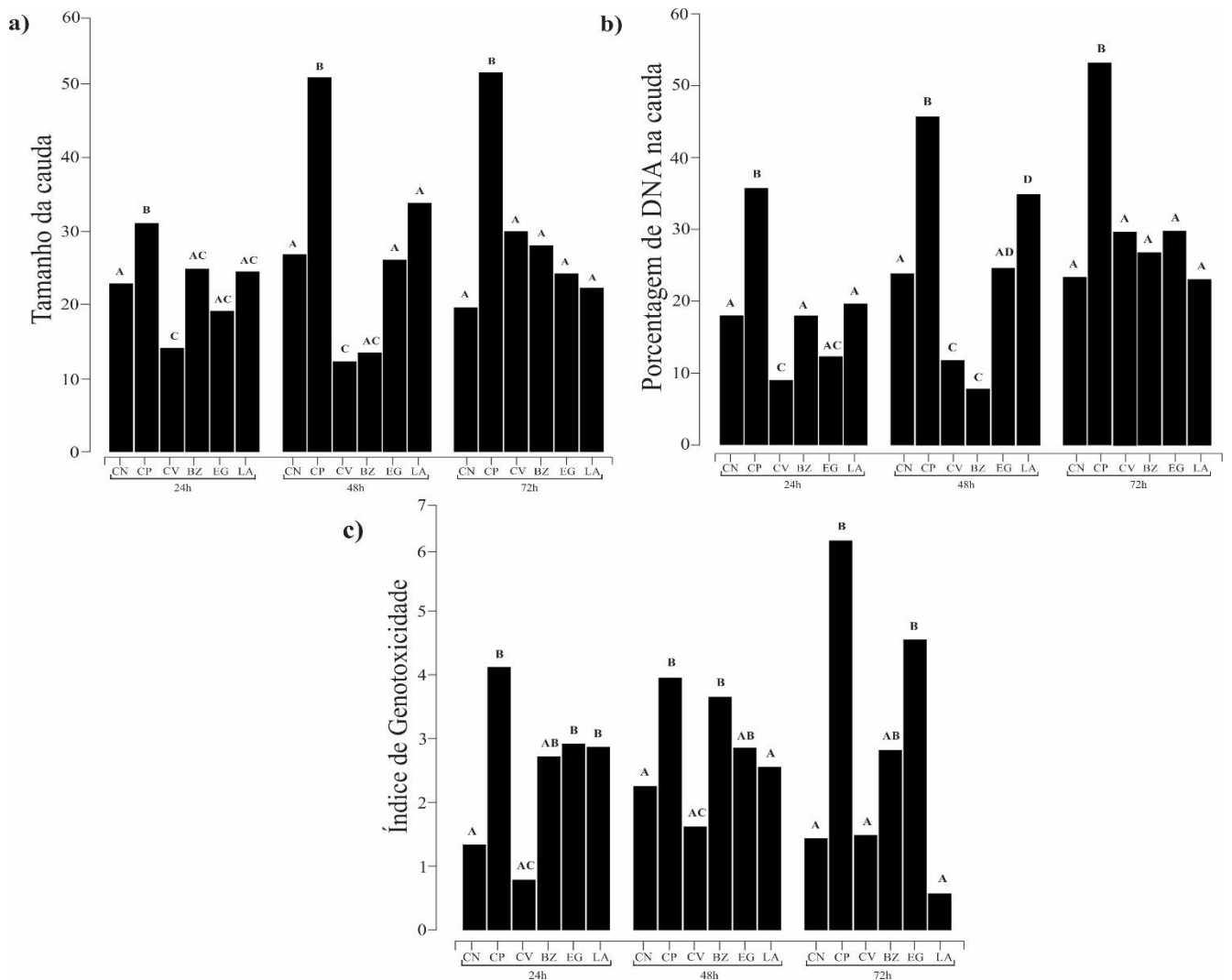


218 **Figura 2.** — Comparação entre os períodos de 24, 48 e 72h em cada tratamento com os compostos
219 anestésicos na espécie *Oreochromis niloticus* para o índice mutagenicidade.

221 (CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; CV- Controle Veículo; BZ- Benzocaína (60 mg/L);
222 EG- Eugenol (60 mg/L); LA- óleo essencial de *Lippia alba* (150 mg/L)).

223 Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos dentro de cada
224 tratamento.

225 Para genotoxicidade analisada por meio do ensaio do cometa foi observado que, quando
 226 comparado os tratamento com os diferentes compostos entre os tempos nos período de 24, 48 e 72h,
 227 o CP foi o que apresentou o maior tamanho de cauda de DNA e porcentagem de DNA na cauda em
 228 relação aos demais tratamentos (Figura 3a e 3b). Além disso, nos períodos de 24, 48 e 72h o
 229 tratamento CV apresentou menores valores para esses mesmos parâmetros avaliados. No entanto,
 230 para o período de 48h, o tratamento BZ foi o que apresentou menor valor significativo ($p < 0,05$).

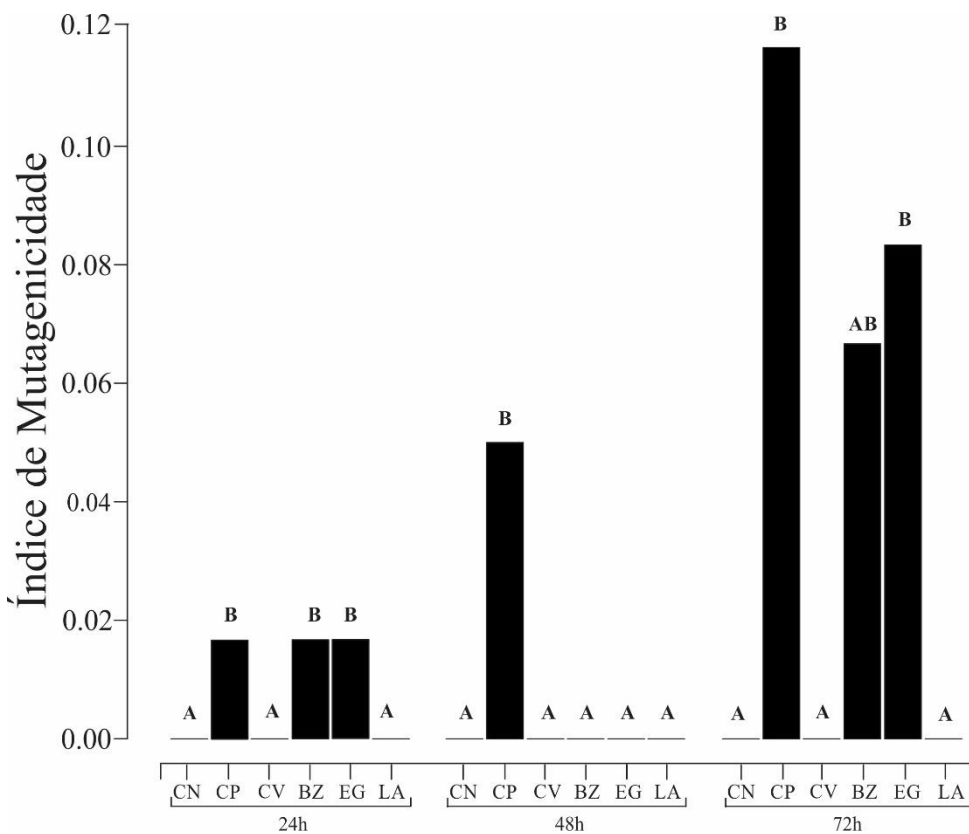


231
 232 **Figura 3.** — Comparação entre os diferentes tratamentos com os compostos anestésicos nos
 233 períodos de 24, 48 e 72h na espécie *Oreochromis niloticus* para tamanho da cauda (a) e
 234 porcentagem de DNA na cauda (b) (parâmetros do ensaio do cometa) e índice de genotoxicidade
 235 baseado em alterações nucleares (c).

236 (CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; CV- Controle Veículo; BZ- Benzocaína (60 mg/L);
237 EG- Eugenol (60 mg/L); LA- óleo essencial de *Lippia alba* (150 mg/L)).

238 Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada
239 período.

240 Para o índice de genotoxicidade analisado com base em resultados referente a alterações
241 nucleares foi possível verificar que o CP mostrou-se eficiente apresentando os maiores valores
242 significativos para esse índice nos três períodos analisados. No período de 24h, os tratamentos EG e
243 LA apresentaram os maiores valores, significativos ($P < 0,05$) para esse parâmetro. No período de
244 48h os maiores valores foram os de BZ, e em 72h o EG (Figura 3c)



245
246 **Figura 4.** — Comparação entre os diferentes tratamentos com os compostos anestésicos nos
247 períodos de 24, 48 e 72h na espécie *Oreochromis niloticus* para o teste de micronúcleo.

248 (CN- Controle Negativo; CP- Controle Positivo; CV- Controle Veículo; BZ- Benzocaína (60 mg/L);
249 EG- Eugenol (60 mg/L); LA- óleo essencial de *Lippia alba* (150 mg/L)).

250 Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada
251 período.

252 Para o índice de mutagenicidade observamos que o CP apresentou aumento significativo
253 da quantidade de micronúcleos ao longo do tempo (24, 48 e 72h). Os tratamento BZ e EG
254 apresentaram mutagenicidade nos períodos de 24 e 72h (Figura 4).

255 Comparando os anestésicos, observamos que os três (BZ, EG e LA) apresentaram
256 genotoxicidade. O EG apresentou maior índice genotóxico em 24 e 48h, e BZ em 48h. A
257 mutagenicidade foi observada no CP em ambos os períodos e nos anestésicos EG e BZ nos períodos
258 de 24 e 48h em *O. niloticus*.

259 **DISCUSSÃO**

260 Com base nos resultados de indução anestésica, apenas o Eugenol[®] (60 mg/L) induziu a
261 anestesia dos peixes de acordo com o tempo proposto por Ross e Ross (2008) e Pereira-da-Silva et
262 al. (2009) que deve ser de 3 a 5 min e o tempo de recuperação após indução à anestesia não deve
263 ultrapassar 5 min. O OE *L. alba* (150 mg/L) e a Benzocaína[®] (60 mg/L) nas concentrações
264 utilizadas levaram mais tempo para indução à anestesia (10 min). Essa variação do tempo de
265 indução pode estar relacionada à concentração do anestésico, tamanho do peixe e condições
266 ambientais (Roubach et al. 2005; Medeiros-Silva et al. 2014). Consenza et al. (2014) observaram
267 indução anestésica em *O. niloticus* da Benzocaína[®] (100mg/L) em 2,58 minutos, Medeiros-Silva et
268 al. (2014), consideraram os tempos de indução e recuperação do Eugenol[®] na concentração de 60
269 mg/L melhor opção para a anestesia em *O. niloticus*. O tempo de recuperação de todos os
270 anestésicos utilizados não ultrapassaram os valores observados em pesquisas realizadas (Ross e
271 Ross 2008; Pereira-da-Silva et al. 2009) .

272 Em relação aos dados biométricos referentes ao tamanho e peso corporal foi observado que
273 estes não influenciaram nas alterações genotóxicas e mutagênicas encontradas no DNA,
274 ocasionadas pelos diferentes anestésicos testados.

275 A Benzocaína[®] ocasionou aumento dos danos genotóxicos em 72h. Esse fato pode ser
276 explicado pela forma de ação sistêmica desse anestésico nos peixes, possuindo um tempo de
277 depuração maior (Delbon e Paiva 2012; Fabregat et al. 2015), quando comparado aos demais

278 anestésicos avaliados. Em alguns países como Estados Unidos e Nova Zelândia, os peixes
279 anestesiados com a Benzocaína[®] devem ser depurados por 21 dias antes do consumo humano (Ross
280 e Ross 2008; Vidal et al. 2008; Souza et al. 2015). A genotoxicidade da Benzocaína[®] pode ser
281 explicada pelo fato desta permanecer por longo período no organismo do animal ocasionando danos
282 ao DNA.

283 Carneiro et al. (2002) observaram que a Benzocaína[®] parece não reduzir o estresse dos
284 peixes ocasionado pelo transporte, também relataram que este anestésico não evitou elevações nos
285 níveis de cortisol plasmático. O cortisol promove danos e interferem no reparo do DNA,
286 contribuindo para a ocorrência de alterações genéticas nesses organismos (Flint et al. 2007). Em
287 pesquisa realizada por Souza et al. (2015) foi observado que o cortisol induziu danos ao DNA em
288 ensaio do cometa realizado em *Danio rerio*.

289 O Eugenol[®] ocasionou aumento de genotoxicidade e mutagenicidade no período de 72h.
290 Guénette et al. (2007) observaram que o Eugenol[®] com administrações sucessivas gera acumulação
291 no organismo do animal. No entanto, estudos relataram que o resíduo do Eugenol[®], em *O. niloticus*,
292 é eliminado do organismo do peixe em até 24 horas (Honczaryk e Inoue 2010; Delbon e Paiva
293 2012; Rodrigues et al. 2016). Souza et al. (2015) afirmaram que os peixes anestesiados com
294 Eugenol[®] não necessitam de depuração. Porém, os resultados destes estudos não corroboram com
295 os relatados no presente trabalho, uma vez que em 72h após a exposição ao mesmo, esse anestésico
296 aumentou o número de alterações genéticas. Porto (2012) relatou a ocorrência de genotoxicidade de
297 Eugenol[®] em cultivo celular, persistindo até 24h após o tratamento.

298 Outro aspecto a ser considerado é que o Eugenol[®] não impede o aumento de cortisol
299 plasmático (Palić et al. 2006). Assim sendo, a genotoxicidade e mutagenicidade ocasionada pelo
300 anestésicos Benzocaína[®] e o Eugenol[®] pode ser explicada pelo aumento do cortisol provocado pelos
301 mesmos.

302 O OE de *L. alba* apresentou genotoxicidade nos períodos de 24 e 48h, sendo que em 72h
303 esse efeito foi menor. O composto majoritário do OE utilizado neste trabalho foi a carvona,

304 caracterizada como quimiotipo III (Hennebelle et al. 2008). Pesquisa realizada por Ventura (2016),
305 utilizando juvenis de pacu, relatou que a depuração deste mesmo composto ocorre em até 6h após a
306 exposição. No entanto, os resultados deste trabalho indicam que mesmo após a depuração relatada
307 por Ventura (2016) este composto causa alterações genotóxicas em até 48h. Embora pesquisas
308 recentes relataram efeito antígenotóxico da carvona (López et al. 2011; Quintero et al. 2017), no
309 presente estudo foi observado genotoxicidade desse composto.

310 É importante ressaltar a atividade antioxidante deste OE de *L. alba* (Azambuja et al. 2011)
311 que atua contra os produtos da peroxidação lipídica que são os principais contribuintes para a perda
312 de função celular, dano do DNA, inativação de enzimas e oxidação hormonal (Kehrer 1993). De
313 acordo com Cunha et al. (2010) e Becker et al. (2016) este anestésico promoveu a inibição da
314 elevação do cortisol plasmático em *Rhamdia quelen*, se tornando uma alternativa aos anestésicos
315 sintéticos.

316 O OE de *L. alba* reduz os níveis de estresse oxidativo no animal (Azambuja et al. 2011) e
317 por ser um anestésico natural é obtido facilmente e não ocasiona danos tanto ao animal quanto ao
318 manipulador.

319 Neste contexto podemos concluir que os anestésicos apresentaram genotoxicidade em
320 todos os tempos analisados. Porém a Benzocaína® e Eugenol® apresentaram maior genotoxicidade
321 em 72 h. Adicionalmente, o OE *L. alba* em 72h apresentou redução significativa de genotoxicidade,
322 indicando que o tempo de depuração dos anestésicos pode influenciar na genotoxicidade. A
323 mutagenicidade foi observada na Benzocaína® e Eugenol® nos períodos de 24 e 72h.

324 Esses resultados sinalizam o tempo ideal para o manejo de *O. niloticus* para cada um dos
325 anestésicos utilizados uma vez que houve resposta diferencial no que se refere aos danos genéticos
326 para cada um dos anestésicos testados. Além disso, esses dados poderão auxiliar o piscicultor diante
327 da necessidade de repetir a anestesia do animal, indicando o tempo ideal de eliminação do efeito
328 genotóxico destes.

329 Este é primeiro estudo evidenciando efeitos genotóxicos e mutagênicos com os anestésicos testados.

330 **AGRADECIMENTOS**

331 Agradeço ao Dr. Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue (EMBRAPA/CPAO), Prof^a. Dr^a. Alexéia
332 Barufatti Grisolia, Dr. Bruno do Amaral Crispim e Dr^a. Lucilene Finoto Viana pela contribuição
333 para este estudo. Aos órgãos financiadores Fundect e CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa e
334 concessão de bolsa de pós-graduação. À UFGD pela oportunidade oportunidade de cursar minha
335 pós graduação.

336 **REFERÊNCIAS**

- 337 ABNT, N. (2011). 14724. Norma Brasileira. Informação e documentação.
- 338 Azambuja, C. R., J. Mattiazzi, A. P. K. Riffel, I. A. Finamor, L. O. Garcia, C. G. Heldwein, B. M.
339 Heinzmann, B. Baldisserotto, M. A. Pavanato, and S. F. Llesuy. 2011. Effect of the essential oil of
340 *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport.
341 Aquaculture 319(1):156-161.
- 342 Barreto, R. E., A. M. M. C. Gontijo, R. O. Alves-de-Lima, V. C. Raymundi, D. Pinhal, V. A. V.
343 Reyes, G. L. Volpato, and D. M. F. Salvadori. 2007. MS222 does not induce primary DNA damage
344 in fish. Aquaculture International 15(2):163-168.
- 345 Becker, A. G., T. V. Parodi, C. G. Heldwein, C. C. Zeppenfeld, B. M. Heinzmann, and B.
346 Baldisserotto. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, ins water with eugenol and
347 the essential oil of *Lippia alba*. Fish Physiology and Biochemistry 38(3):789-796.
- 348 Becker, A. G., T. V. Parodi, C. C. Zeppenfeld, J. Salbego, M. A. Cunha, C. G. Heldwein, V. L.
349 Loro, B. M. Heinzmann, and B. Baldisserotto. 2016. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen*
350 in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. Fish
351 physiology and biochemistry 42(1):73-81.
- 352 Carneiro, P. C. F., E. C. Urbinati, and M. L. Martins. 2002. Transport with different benzocaine
353 concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of
354 matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869)(Osteichthyes, Characidae). Acta Scientiarum 24(2):555-
355 560.
- 356 Carrasco, K. R., K. L. Tilbury, and M. S. 1990. Mayers. Assessment of the piscine micronuclei test
357 as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. Canadian Journal Fisheries and
358 Aquatic Sciences, 47(11):2123-2136.
- 359 Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith,
360 and R. Štětina. 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23(3):143-151.
- 361 Cosenza, G. R., , G. S. Claudiano, P. F. Marcusso, S. F. Eto, W. G. Manrique, B. A. Loureiro, M. T.
362 Shimada, R. Salvador, J. R. Moraes, and F. R. Moraes. Influence of glyceryl guaiacolate ether on
363 anesthetics in tilapia compared to benzocaine and eugenol. 2014. Revista MVZ Córdoba
364 19(1):3944-3953.

- 365 Cunha, M. A, F. M. C. Barros, L. O. Garcia, A. P. L. Veeck, B. M. Heinzmann, V. L. Loro, T.
366 Emanuelli, and B. Baldisserotto. 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver
367 catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 306(1-4):403-406.
- 368 Çavas, T., and S. Ergene-Gözükara. 2005a. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the
369 piscine micronucleus test by acridine Orange fluorescent staining. *Environmental Toxicology and*
370 *Pharmacology* 19:107-111.
- 371 Çavas, T., and S. Ergene-Gözükara. 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in
372 *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant
373 effluents. *Aquatic Toxicology* 74:264-271.
- 374 Delbon, M. C. E., and M. J. T. R. Paiva. 2012. Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo:
375 concentrações e administrações sucessivas. *Boletim do Instituto de Pesca* 38(1):43-52.
- 376 Escobar, P., S. M. Leal, L. V. Herrera, J. R. Martinez, E. Stashenko. 2010. Chemical composition
377 and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components.
378 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(2):184-190.
- 379 Fabiani, B. M., W. R. Boscolo, A. Feiden, O. Diemer, F. Bittencourt, and D. H. Neu. Benzocaína e
380 eugenol como anestésicos para piraputanga (*Brycon hilarii*). 2013. *Acta Scientiarum. Animal*
381 *Sciences* 35(2):113-117.
- 382 Fabregat, T. E. H. P., M. M. Pereira, T. B. Assahina, J. A. Broggi. 2015. Uso do eugenol em bettas:
383 estudo de diferentes concentrações e administrações sucessivas. *Boletim do Instituto de Pesca*
384 41(2):365-371.
- 385 Fabri, R. L., M. S. Nogueira, J. R. Moreira, M. L. M. Bouzada, and E. Scio. 2011. Identification of
386 antioxidante and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *Journal of*
387 *Medicinal Food* 14(7-8):840-846.
- 388 Flint, M. S., A. Baum, W. H. Chambers, and F. J. Jenkins. 2007. Induction of DNA damage,
389 alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones.
390 *Psychoneuroendocrinology* 32(5):470-479.
- 391 Gomes, L. C., A. R. Chippari-Gomes, N. P. Lopes, R. Roubach, and C. A. R. M. Araujo-Lima.
392 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Collossoma macropomum*.
393 *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4):426-431.
- 394 Guénette, S. A., F. C. Uhland, P. Hélie, F. Beaudry, and P. Vachon. 2007. Pharmacokinetics of
395 eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266(1-4):262-265.
- 396 Heddle, J. A., M. Hite, Ba. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, Go. W. Newell, and M.
397 F.Salamone. 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S.
398 *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 123(1):61-118.
- 399 Hennebelle, T., S. Sahpaza, H. Joseph, and F. Bailleul. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*.
400 *Journal of Ethnopharmacology* 116(2):211-222.
- 401 Honczaryk, A., and L. A. K. A. Inoue. 2010. Anestesia do pirarucu por aspersão da benzocaína
402 diretamente nas brânquias. *Ciência Rural* 40(1):1-4.

- 403 Inoue, L. A. K. A., L. O. B. Afonso, G. K. Iwama, and G. Moraes. 2005. Effects of clove oil on the
404 stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica* 35(2):289-
405 295.
- 406 Inoue, L. A. K. A., A. Hackbarth, and G. Moraes. 2010. Benzocaína sobre respostas ao estresse do
407 matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção*
408 *Animal* 11(3):909-918.
- 409 Kehrer, J. P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in*
410 *toxicology* 23(1):21-48.
- 411 López, M. A., E. E. Stashenko, and J. L. Fuentes. 2011. Chemical composition and antigenotoxic
412 properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and molecular biology* 34(3):479-488.
- 413 Marking, L. L., and F. P. Meyer. 1985. Are better fish anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*
414 10(6): 2-5,
- 415 Maršić-lucic, J., I. Mladineo, and M. Tudor. 2005. Comparative effectiveness of 2phenoxyethanol
416 and propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture International*
417 13(6):43-553.
- 418 Medeiros-Silva, R. M., E. L. R. Lima, M. A. S. Neto, and H. A. Andrade. 2014. Eugenol na
419 anestesia da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Agrarian* 7(26):590-597.
- 420 Nogueira, M. A., G. Diaz., and L. Sakumo. 2007. Caracterização química e atividade biológica do
421 óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e*
422 *Aplicada* 289(3):273 – 278.
- 423 Oliveira, J. R., J. L. Carmo, K. K. C. Oliveira, and M. C. F. Soares. 2009. Cloreto de sódio,
424 benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de*
425 *Zootecnia* 38(7):1163-1169.
- 426 Palić, D., D. M. Herolt, C. B. Andreasen, B. W. Menzel, and J. A. Roth. 2006. Anesthetic efficacy
427 of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and
428 neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture*
429 254(1-4):675-685.
- 430 Parodi, T. V., M. A. Cunha, C. G. Heldwein, D. M. Souza, Á. C. Martins, L. O. Garcia, W. W.
431 Junior, J. M. Monserrat, D. Schmidt, B. O. Caron, B. Heinzmann, and B. Baldisserotto. 2012. The
432 anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-
433 larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative Biochemistry*
434 *and Physiology* 155(3):462-468.
- 435 Pereira-da-Silva, E. M., R. H. F. Oliveira, M. A. R. Ribeiro, and M. P. Coppola. 2009. Efeito
436 anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. *Ciência Rural* 39(6):1851-1856.
- 437 Porto, M. D. P. 2012. Ação moduladora do citral e eugenol em eventos genéticos em magrófagos
438 murinos *in vitro*. *Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.*
- 439 Quintero, R. N., Y. C. Córdoba, E. E. Stashenko, and J. L. Fuentes. 2017. Antigenotoxic Effect
440 Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species.
441 *Photochemistry and photobiology* 93(4):1063-1072.

442 R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for
443 statistical computing, Vienna. [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org)

444 Ramsdorf, W. A., F. S. F. Guimarães, M. V. M. Ferraro, J. Gabardo, E. S. Trindade, and M. M.
445 Cestari. 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for
446 analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research/Genetic Toxicology and*
447 *Environmental Mutagenesis* 673(1):78-81.

448 Rezende, F. P., L. M. Pascoal, R. A. Vianna, and E. A. T. Lanna. 2017. Sedation of nile tilapia with
449 essential oils: tea tree, clove, eucalyptus, and mint oils. *Revista Caatinga* 30(2):479-486.

450 Rodrigues, R. B., I. W. A. Melo, J. D. M. Rocha, T. C. Silva, V. R. C. Bridi, A. Signor, F.
451 Bittencourt, and W. R. Boscolo. 2016. Tempo de indução e recuperação à anestesia da benzocaína
452 para patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*). *Revista Brasileira de Higiene e*
453 *Sanidade Animal* 10(3):364-373.

454 Ross, L. G., and B. Ross. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3. ed.
455 Oxford: Blackwell Publishing.

456 Roubach, R., L. C. Gomes, F. A. L. Fonseca, A. L. Val. 2005. Eugenol as na efficacious anaesthetic
457 for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research* 36(11):1056-1061.

458 Sanchez-Galan, S., A. R. Linde, J. I. Izquierdo, E. García-Vázquez. 1998. Micronuclei and
459 fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor
460 freshwater ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*
461 412(3):219-225.

462 Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and*
463 *Related Subjects* 31(1):9-15.

464 Silva, R. R. P., O. R. Pires, and C. K. Grisolia. 2011. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus*
465 (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon* 58(3):259-
466 264.

467 Silva, L. L., T. V. Parodi, P. Reckziegel, V. O. Garcia, M. E. Bürger, B. Baldisserotto, C. A.
468 Malmann, A. M. S. Pereira, and B. M. Heinzmann. 2012. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L:
469 anesthetic effect, mechanism of action and tolerance in silver catfish. *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*
470 350-353:91-97.

471 Soares, B. V., and M. Tavares-Dias. 2013. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo
472 e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* 3(1):109-123.

473 Souza, R. A. R., C. V. A. Carvalho, and F. Flores. 2012. Efeito comparativo da benzocaína, mentol
474 e eugenol como anestésicos para juvenis de robalo peva. *Boletim do Instituto de Pesca* 38:247-255.

475 Souza, R. L. M., M. B. Vettorazzi, R. K. Kobayashi, and M. A. A. F. Neto. 2015. Eugenol as an
476 anaesthetic in the management of farmed lane snapper, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Revista*
477 *Ciência Agrônômica* 46(3):532-538.

478 Sousa, M. L., F. Figueiredo, C. Pinheiro, A. Silva, F. Malhao, M. J. Rocha, and R. Urbatzka. 2015.
479 Morphological and molecular effects of cortisol and ACTH on zebrafish stage I and II Follicles.
480 *Reproduction* 150(5):429-436.

- 481 Thurmon, J. C.; W. J. Tranquilli, and G. J. Benson. 1996. Anesthesia of wild, exotic and laboratory
482 animals. Lumb and Jones, veterinary anesthesia. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 483 Valença-Silva, G., M. G. Braz, R. E. Barreto, D. M. F. Salvadori, and G. L. Volpato. 2014. Low
484 dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile Tilapia.
485 Transactions of the American Fisheries Society 143(2):414-419.
- 486 Veeck, A. P. L., B. Klein, L. F. Ferreira, A. G. Becker, C. G. Heldwein, B. M. Heinzmann, B.
487 Baldisserotto, and T. Emanuelli. 2013. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver
488 catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. Journal of the Science
489 of Food and Agriculture 93(4):955-960.
- 490 Ventura, B. C. 2004. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida
491 atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Dissertação de
492 Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- 493 Ventura, A. S. 2016. Óleos essenciais de *Lippia alba* e *Lippia sidoides* e seus efeitos fisiológicos
494 em *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Mato Grosso do
495 Sul, Dourados.
- 496 Viana, L. F., Y. R. Suárez, C. A. L. Cardoso, J. C. J. Solórzano, B. A. Crispim, A. B. Grisolia, S. E.
497 Lima-Junior. 2017. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to
498 Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. Archives of Environmental Contamination
499 and Toxicology 1-8.
- 500 Vidal, L. V. O., R. C. B. Albinati, A. C. L. Albinati, A. D. Lira, T. R. Almeida, and G. B. Santos.
501 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43(8):1069-
502 1074.