

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

VANESSA MENEGATTI MARCONDES

**UTILIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA
ALBA* NO TRANSPORTE DE ALEVINOS DE
SURUBIM (*PSEUDOPLATYSTOMA SP*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

ABRIL/2015

VANESSA MENEGATTI MARCONDES

UTILIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* NO TRANSPORTE DE ALEVINOS DE SURUBIM (*PSEUDOPLATYSTOMA SP*)

ORIENTADOR: Profa.Dra. MARCIA REGINA RUSSO
CO-ORIENTADOR: Dra. TARCILA SOUZA DE CASTRO SILVA

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração de Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

ABRIL/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M321u Marcondes, Vanessa.
Utilização do óleo essencial de *Lippia Alba* no transporte de alevinos de surubim (*PSEUDOPLATYSTOMA SP*). / Renato Suekane. – Dourados, MS : UFGD, 2015.
46f.

Orientador: Prof. Dr. Marcia Regina Russo.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)
– Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Hematologia. 2. Cortisol. 3. Fisiologia. 4. Estresse. 5. Glicose. 6. Transporte. I. Título.

CDD – 616.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

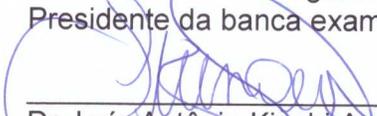


Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Utilização do óleo essencial de *Lippia alba* no transporte de alevinos de surubim (*Pseudoplatystoma sp*)**”, de autoria de **Vanessa Menegatti Marcondes**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Russo
Presidente da banca examinadora



Dr. Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue
Membro Examinador (EMBRAPA)



Prof.ª Dr.ª Alexeia Barufatti Grisolia
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 13 de Abril de 2015.

Dedico

*A Deus ao qual devemos toda honra e toda glória.
Ao meu esposo e a minha filha, pela compreensão,
incentivo, confiança e carinho, não apenas nesta
etapa, mas em todos os momentos da minha vida.
Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e
sempre me incentivaram na conclusão deste
trabalho.*

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me sustentado e me dado força para superar as dificuldades e por sempre me abençoar durante toda a caminhada da minha vida.

Ao meu esposo Isaac e a minha filha Ingrid, pelo amor, pela compreensão pelo incentivo e apoio incondicional durante todo este tempo de estudo.

Aos meus irmãos e familiares que sempre me incentivaram a superar os obstáculos.

A minha orientadora Dr.^a Marcia Regina Russo pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

A minha co-orientadora Tarcila Souza de Castro Silva pela transmissão dos seus conhecimentos.

Aos meus amigos Ricardo, Debora e Juliana que colaborou nos experimentos da pesquisa.

A minha amiga Claucia Aparecida Honorato, que soube além de transmitir seus conhecimentos, transmitiu suas experiências, me apoiando nas dificuldades e nas horas de aflição.

Ao Ministério da Agricultura e Pecuária pelo auxílio financeiro.

A Embrapa Agropecuária Oeste –CPAO, pela disponibilidade do Laboratório de Aqüicultura para que fosse realizado as coletas do experimento.

A todos que percorreram comigo os caminhos da vida, me deu esperança e capacidade de “sonhar um sonho” que agora se realiza.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	14
2 ESTRESSE.....	15
3 PROCESSOS DO ESTRESE.....	16
4 TIPOS DE RESPOSTA AO ESTRESSE.....	18
4.1 Resposta Primária.....	18
4.1 Resposta Secundária.....	20
4.3 Resposta Terciária.....	21
5 SISTEMA IMUNE, CÉLULAS E FUNÇÕES EM PEIXES.....	22
6 TRANSPORTE	23
7 ANESTÉSICOS PARA PEIXES DERIVADOS DE PLANTAS.....	23
8 HIPÓTESES.....	26
9 OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo Geral.....	27
5.2 Objetivo Específico	27
10 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	28
CAPÍTULO ÚNICO- Influência do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> sobre respostas ao estresse de surubim (<i>Pseudoplatystoma sp</i>) submetidos ao transporte	34
Abstract	34
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados	37
Discussão.....	37
Conclusão	37
Referências.....	38
11 CONCLUSÃO GERAL.....	45
ANEXO.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AT – Antes do transporte

CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

cm - centímetro

dl- Decilitro

DT – Depois do transporte

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

g- Grama

h- Horas

HB- Hemoglobina

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

HTO- Hematócrito

L- Litro

mL- Mililitro

mg – Miligrama

MS-222 – Tricáina Metanosulfato

pH- Potencial Hidrogeniônico

RPM- Rotação Por Minuto

μl-Microlitro

μg-Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeitos primários e secundários ao estresse.....	21
Figura 2 – Cortisol (A) e glicose (B) (média \pm DP) em <i>Pseudoplatystoma sp</i> após 4 horas de transporte com óleo essencial de <i>Lippia alba Mill</i>	42
Figura 3 - Cortisol (A) e glicose (B) (média \pm DP) em <i>Pseudoplatystoma sp</i> após recuperação de 24 horas ao transporte com óleo essencial de <i>Lippia alba Mill</i>	42
Figura 4 Cortisol (A) e glicose plasmática (B) (média \pm DP) em <i>Pseudoplatystoma sp</i> após recuperação de 48 horas ao transporte com óleo essencial de <i>Lippia alba Mill</i>	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Eletrólitos e índices hematológicos de surubim após serem submetidos ao transporte.....	43
Quadro 2. Variáveis físicas e químicas da água após 4h de transporte em sacos plásticos sob influência da <i>Lippia alba Mill</i>	43

ANEXO

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA)

(Brazilian Journal of Veterinary Research)

Print ISSN: 0100-736X

Online: 1678-5150

RESUMO

O transporte de peixes na aquicultura é uma atividade indispensável ao sistema de produção, no entanto este manejo promove reações adversas ao peixe ocasionando o estresse. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do óleo essencial de *Lippia alba* sobre respostas ao estresse de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte em sacos plásticos durante 4 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) constituído de diferentes doses de *Lippia alba* (0, 4, 8, 12, 16 mgL⁻¹) com três repetições. Foram utilizados 150 juvenis de surubim *Pseudoplatystoma sp* com peso $58,6 \pm 9,2$ g e $17,3 \pm 1,4$ cm. Foram realizadas coletas de sangue nos peixes de cada tratamento (n=9), antes do transporte, depois do transporte, 24h e 48h após transporte, para avaliação dos parâmetros hematológicos, eletrolíticos (Na, K), glicemia e cortisol. Os resultados foram submetidos à análise de variância (P<0,05) e as médias quando significativas foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Os resultados não apresentaram efeitos na diminuição do estresse, apesar de ter diminuído a movimentação dos peixes durante o transporte. As concentrações utilizadas de *Lippia alba* promoveu aumento dos níveis de glicose plasmáticos nos surubins, entretanto, o cortisol, equilíbrio eletrolítico e os índices hematológicos, não foram alterados, demonstrando que o uso de *Lippia alba* independente da dose atuou como agente estressor.

Palavras-chave: hematologia, cortisol, fisiologia, estresse, glicose, transporte

ABSTRACT.-

The transport of fish in aquaculture is an essential practice however this management promotes adverse reactions of fish, stress. This study evaluated the influence of essential oil of *Lippia alba* on stress responses of catfish (*Pseudoplatystoma* sp) submitted to transport in plastic bags for 4 hours. The experimental design was completely randomized (DIC) consisting of different concentrations of *Lippia alba* (0, 4, 8, 12, 16 mg L⁻¹) with three replications. 150 juvenile catfish *Pseudoplatystoma* sp were used. Mean body weight and length were 58.6 ± 9.2 g and 17.3 ± 1.4 cm. Blood samples were taken in fish at the times: before shipping, after transport, 24h and 48h after transport in all treatments (n = 9) for evaluation of hematological, electrolytic (Na, K), plasma glucose and cortisol. The results were submitted to analysis of variance (P <0.05) and mean when significant were compared by Tukey test (P <0.05). The results showed no effect on the reduction of stress, although it decreased fish handling during transport. The concentrations used of *Lippia alba* promoted increased plasma glucose levels in surubins, however, cortisol, electrolyte balance and blood indexes, have not changed, demonstrating that the use of *Lippia alba* independent of dose served as stressor.

Keywords: hematology, cortisol, physiology, stress, glucose, transport

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira dispõe de uma grande diversidade de espécies com potencial para criação, entre elas destaca-se o surubim (*Pseudoplatystoma sp*), por ser uma espécie muito apreciada pela qualidade organoléptica de sua carne assim como na pesca esportiva. Contudo, esta espécie passa por várias intervenções de manejo durante seu desenvolvimento nas pisciculturas, que provocam estresse, deixando-o mais susceptível a doenças aumentando as taxas de mortalidade (BEELEN et al., 2003).

Nos sistemas de criação intensiva de peixes, estes são expostos a alteração da qualidade da água, ao manejo excessivo, ao transporte e ao adensamento, o que pode causar estresse, trazendo consequência no desempenho produtivo, imunidade e resistência a patógenos (WENDELAAR BONGA, 1997)

O estresse é condição fisiológica a qual o equilíbrio de determinado organismo com o ambiente é quebrado por fatores extrínsecos ou intrínsecos, podendo ser denominado estressor. Quando os peixes estão à frente a um agente estressor eles através do metabolismo respondem em reações em cadeia. No entanto, essa resposta pode ser deletéria à saúde, quando seus mecanismos são forçados além de seus limites normais (BARTON e IWAMA, 1991).

O transporte dos peixes envolve captura, confinamento, manuseio e adensamento sendo indispensável na aquicultura, mas, o conhecimento das respostas ao estresse no transporte é primordial para as práticas de manejo, podendo reduzir a mortalidade pós-transporte. Sendo assim, o uso de anestésico pode promover o efeito mitigador do estresse em peixes (WENDEMEYER, 1996)

Na literatura alguns estudiosos reportam que anestésicos tem sido utilizados como auxílio na diminuição do estresse, já que reduzem a atividade muscular e o metabolismo dos peixes diminuindo a injúria física, consumo de oxigênio e excreção de metabólicos tóxicos. Geralmente ocorre a diminuição da liberação de cortisol, que tem papel preponderante na inibição do estresse. As mudanças fisiológicas causadas pelo estresse são importantes para a elaboração de programas de manejo na aqüicultura (LIMA et.al, 2006).

Os anestésicos são muito utilizados na piscicultura para diminuir facilitar o manejo e algumas vezes diminuir mortalidade. Diversos produtos químicos são

utilizados como anestésico em peixes, sendo os mais comuns: a tricafina metano sulfato, a quinaldina e o 2-fenoxietanol. Contudo, estes anestésicos são de complexa obtenção e apresentam alto custo (FAÇANHA e GOMES, 2005).

Logo, justifica-se a necessidade de procurar alternativas seguras para procedimentos de anestesia de peixes no Brasil, auxiliando as autoridades responsáveis por este tipo de regulamentação. O uso do óleo essencial do gênero *Lippia alba Mill* em peixes pode ser uma alternativa viável frente ao alto custo e dificuldades de obtenção dos produtos químicos utilizados na aquicultura, por existir relatos de sua ação como sedativo, podendo ser utilizado com segurança tanto para a indução anestésica, manejo e transporte de peixes.

2 Estresse

O ambiente aquático, sobretudo os utilizados para piscicultura, sofrem mudanças drásticas nos parâmetros químicos tais como: pH, oxigênio dissolvido, concentração elevada de amônia (COSTA et al., 2004), presença de poluentes orgânicos e inorgânicos (CARVALHO e FERNANDES, 2006), assim como nos agentes físicos como o manuseio, alta densidade populacional, captura, confinamento e transporte (URBINATI et al., 2004), sendo considerados como fatores estressantes podendo afetar o metabolismo e o crescimento dos peixes (WENDEMEYER, 1996).

O estresse pode ser definido basicamente como um estímulo que provoca esforço do organismo para enfrentar situações ameaçadoras ocasionando alteração no equilíbrio interno do peixe. De acordo com alguns autores (Silveira, Logato e Pontes, 2009; Galhardo e Oliveira, 2006), podemos considerar o estresse como uma condição em que o animal é impossibilitado de manter um estágio fisiológico normal devido a fatores chamados estressores. Assim, estresse é um conjunto de respostas não específicas do organismo a situações que desequilibram a sua homeostase, envolvendo o Sistema Nervoso Autônomo, provocando um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória ou adaptativa habilitando o animal a superar as ameaças do ambiente (WENDEELAR-BONGA, 1997).

Os agentes estressores podem ser classificados como de curta ou longa duração, podendo proporcionar diferentes intensidades. A exposição curta a esses agressores podem produzir nos peixes uma resposta adaptativa, que restabelece o equilíbrio do organismo, contudo, se estiverem sujeitos a agentes de estresse prolongados, a resposta pode tornar-se não-adaptativa, trazendo conseqüências para saúde e bem-estar dos peixes (SILVEIRA, LOGATO e PONTES, 2009).

Dependendo da severidade do estressor, o organismo se torna disfuncional e pode impactar a fisiologia do animal. O objetivo da adaptação ao estresse é a realocação de energia para as atividades do aumento da demanda energética, como reprodução e crescimento, e em direção a atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase, tais como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos. Tal dinâmica pode reduzir consideravelmente o desempenho do peixe, tanto durante a fase de reestabelecimento frente a um estresse agudo, quanto no estresse crônico (SCHRECK, 1981; SCHRECK, 1990; KEBUS et al., 1992; PANKHURSK e KRAAK, 1997; MOMMSEN et al., 1999).

O estresse ocasiona uma série de respostas denominadas Síndrome Geral de adaptação sendo classificadas em três estágios: o primeiro estágio é uma reação de alarme, caracterizada como uma resposta rápida (luta ou fuga) ocasionando alterações fisiológicas inicial ao estímulo a fim de compensar o distúrbio. O segundo estágio é a fase de resistência, onde o organismo adapta ao distúrbio a fim de recuperar a homeostase. Se o estresse persistir a longo prazo o organismo entra no terceiro estágio considerado como exaustão, onde a adaptação não pode ser mais possível (ABREU e URBINATI, 2006; LIMA, et al., 2006; OLIVEIRA e GALHARDO, 2007; GONÇALVES, et al., 2008).

3 Processos do estresse

A resposta ao estresse envolve a ativação de dois eixos neuroendócrinos, hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), que libera os corticosteroides (cortisol e cortisona) e o eixo hipotálamo, sistema nervoso simpático - células cromafins (HSC), que libera catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) como produtos. As ações destes hormônios em diversos órgãos alvos, que estão sob múltiplo controle

endócrino, podem ocasionar alterações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse (OBA, MARIANO e ROMAGUEIRA, 2009).

As respostas fisiológicas de estresse são estimuladas em sistema de cascata, desencadeando respostas em defesa do organismo, através da ativação do hipotálamo, assim como do efeito do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), considerado com principal regulador da produção e secreção de cortisol. O ACTH é secretado na hipófise pelo hipotálamo via hormônio liberador de corticotropina (CRH), mediado pelo hormônio melanócito estimulante (MSH) e, possivelmente, por endorfina. Este hormônio é liberado na corrente sanguínea e quando chega às células inter-renais (do rim cefálico), estimula a produção e liberação de hormônios corticosteróides e, uma vez na corrente sanguínea, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) atinge o tecido inter-renal, promovendo a liberação do cortisol (WEENDELAR-BONGA, 1997).

De acordo com Popp, (2006), a resposta ao estresse abrange a intensificação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, estimulando o tecido adreno-cortical a sintetizar e secretar glicocorticóides em maior quantidade, sendo estimulado em respostas ao estresse (PICKERING, 1993). As brânquias, o intestino e o fígado são órgãos alvo do cortisol em peixes, esses órgãos refletem as principais ações do cortisol, ou seja, balanço hidromineral e metabolismo energético (OBA, MARIANO e ROMAGUEIRA, 2009).

De acordo com Wedeelar Bonga (1997) em todos os grupos de vertebrados, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são liberadas na circulação sob condições que requerem um incremento no transporte de oxigênio do sangue e a mobilização de substratos energéticos. Por outro lado em peixes, as células cromafins são o órgão homólogo à medula adrenal dos mamíferos e são a principal fonte das catecolaminas circulantes, podendo ocorrer espalhadas ou em pequenos ajuntamentos na porção cranial do rim. Desse modo, diferente dos mamíferos, uma quantidade significativa de catecolaminas circulantes, em particular de noradrenalin, advém de uma secreção dos nervos simpáticos, sendo esse processo restrito aos peixes, podendo ser divididas em três categorias, primárias, secundárias e terciárias (SILVEIRA, LOGATO E PONTES, 2009).

4 Tipos de resposta ao estresse

4.1 Resposta Primária

Faz-se fundamental para o estudo de estresse do peixe sua distinção entre os tipos de resposta primária, secundária e terciária (Pickering, 1987; Pickering e Pottinger, 1995; Barton, 2002).

A resposta primária ou reação de alarme, incluindo a reação neuroendócrina, são hormonais, detectadas através dos órgãos sensoriais que chegam ao hipotálamo estimulando a liberação de corticotropinas sendo caracterizada pelo aumento dos hormônios corticosteroides (cortisol), no sangue principalmente das células inter-renais. A concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) das células cromafins da medula supra-renal tem como função estimular a hidrólise de reserva de glicogênio no fígado, aumentando os batimentos cardíacos e os níveis de glicose no sangue bem como a diminuição da proteína muscular (CARNEIRO e URBINATE, 2001).

Na corrente sanguínea os níveis de catecolaminas se elevam rapidamente e são distribuídos por todo o organismo, dando início aos efeitos secundários induzindo a várias alterações metabólicas, incluindo os níveis de glicose, cortisol, hematológicos (hematócritos, eritrócitos e hemoglobinas) (MARIANO, 2006) e osmorregulatórias (eletrólitos) (MAZEAUD e MAZEAUD, 1981).

Segundo Nolan, (2000) e Castro e Fernandes, (2009), a elevação da perfusão branquial ocorre devido ao aumento das catecolaminas no sangue, ocasionando a perda de íons para o meio externo, levando a um desequilíbrio iônico. As catecolaminas também estimulam a glicogenólise (conversão de glicogênio em glicose realizada no fígado), levando a uma hiperglicemia, disponibilizando energia para o organismo fugir ou se adaptar as novas condições ambientais, sendo considerado que o estresse pode induzir o aumento de glicose plasmática no sangue em resposta a estímulos adversos (BARCELLOS et al.,2003).

O aumento da glicose, considerado hiperglicemia, está relacionada ao estresse sendo mediada principalmente pelos efeitos das catecolaminas (Barton e Iwama, 1991) e da liberação de glicose hepática, o principal carboidrato reserva do

peixe. Existem evidências para o envolvimento de catecolaminas na mobilização de ácidos graxos livres, que são importantes fontes de energia para o peixe (VAN DER BOON et al., 1991; PICKERING e POTTINGER, 1995). A glicose plasmática é utilizada como um dos indicadores mais importantes, juntamente com o cortisol para diagnosticar o estresse nos peixes (WEDEMEYER, 1996).

Para o corticosteróide (cortisol) estudos tem demonstrado que ele contribui para a regulação das vias da gliconeogenese e glicogênese. Uma das funções do cortisol durante o estresse é suprir a demanda energética dos peixes, no entanto, deprime o sistema imunológico. Assim, embora os corticosteróides tenham ação antiinflamatória, inibem o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para a região lesionada (BAGLIOLI, 2008).

Os três órgãos mais afetados pelo cortisol são: as brânquias, intestino e fígado, pois refletem sobre os hormônios que controlam do balanço hidromineral e do metabolismo energético nos peixes. Sua atuação ocorre nos receptores intracelulares, os mineralocorticóides e glicocorticóides. Sua atuação sobre os mineralocorticóides está relacionada à regulação osmótica e iônica estimulando a diferenciação de células de cloreto nas brânquias e elevando a atividade da bomba de sódio-potássio, que tem como principal função o transporte ativo dos íons sódio e cloreto. Em sua função como glicocorticóide, o cortisol estimula a glicogenólise e a gliconeogenese, contribuindo para a perda de peso no estresse crônico, influenciando no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (FILHO e FIORUCCI, 2005).

Durante o estresse, o cortisol tem a função de suprir a demanda energética, no entanto, pode afetar a imunidade do peixe. O efeito catabólico do cortisol no estresse crônico é considerado responsável pelo crescimento do peixe, estimulando a liberação do hormônio de crescimento (GH), sendo secretado pela glândula pituitária, sendo inibida pelos peixes em condições de estresse (PICKERING, 1993).

Devido à exposição a agentes estressores, uma das respostas mais perceptíveis do peixe é a cessação da alimentação, influenciada por efeitos catabólicos das catecolaminas e corticosteróides sobre as reservas energéticas, resultando na diminuição do crescimento nos peixes estressados. Essa redução acontece devido ao cortisol exercer função inibitória sobre a síntese protéica podendo ser utilizado como indicador de crescimento somático (OBA, MARIANO, ROMAGUEIRA, 2009).

Vale ressaltar que quando o peixe é exposto a agentes estressores repetidamente ou cronicamente, o nível de cortisol se mantém elevado durante vários dias ou até mesmo semanas, levando uma redução em número ou na sensibilidade dos receptores de cortisol nos tecidos dos peixes, apresentando conseqüência frente a outros agentes estressores (JOBBLING, 1994).

4.2 Resposta Secundária

A resposta secundária é considerada uma fase de resistência ou adaptação do peixe, frente ao aumento dos níveis de catecolaminas e corticosteróides, incluindo várias alterações na taxa de circulação de outros hormônios (pituitária e tireóide), reconversão de neurotransmissores cerebrais, elevação da taxa cardiorrespiratória e mobilização de energia (CARNEIRO, 2001).

Os efeitos metabólicos incluem hiperglicemia, hiperlactacemia, depleção das reservas glicogênicas, lipólise e inibição da síntese protéica. Um aumento do catabolismo de proteínas musculares e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres, colesterol, depleção das reservas de ácido ascórbico, principalmente no tecido inter-renal podem ocorrer na resposta secundária (PICKERING, 1993; PICKERING e POTTINGER, 1995; MILLIGAN, 2003).

As catecolaminas podem causar distúrbios osmorregulatórios resultantes da diurese e perda de eletrólitos sanguíneos, bem como mudanças hematológicas, tanto nos glóbulos vermelhos, quanto nos glóbulos brancos podendo resultar em leucopenia, ocasionar a hemodiluição ou hemoconcentração sobre o sistema cardiovascular, aumentar o fluxo sanguíneo, a perfusão braquial, assim como a capacidade de transportar oxigênio no sangue (McDONALD e MILLIGAN, 1997). No entanto, o cortisol estimula o transporte iônico presente nas brânquias e nos rins elevando os níveis de eletrólitos no meio hipotônico e hipertônico (CECH et al., 1996).

Os fluidos corporais devem ser monitorados o tempo todo, sendo difícil identificar o momento exato em que o efeito causado por um estímulo pode afetar a condição normal do peixe, no entanto, os efeitos na regulação osmótica e eletrolítica

são aparentes e a saúde do peixe apresenta comprometida (McDONALD e MILLIGAN, 1997).

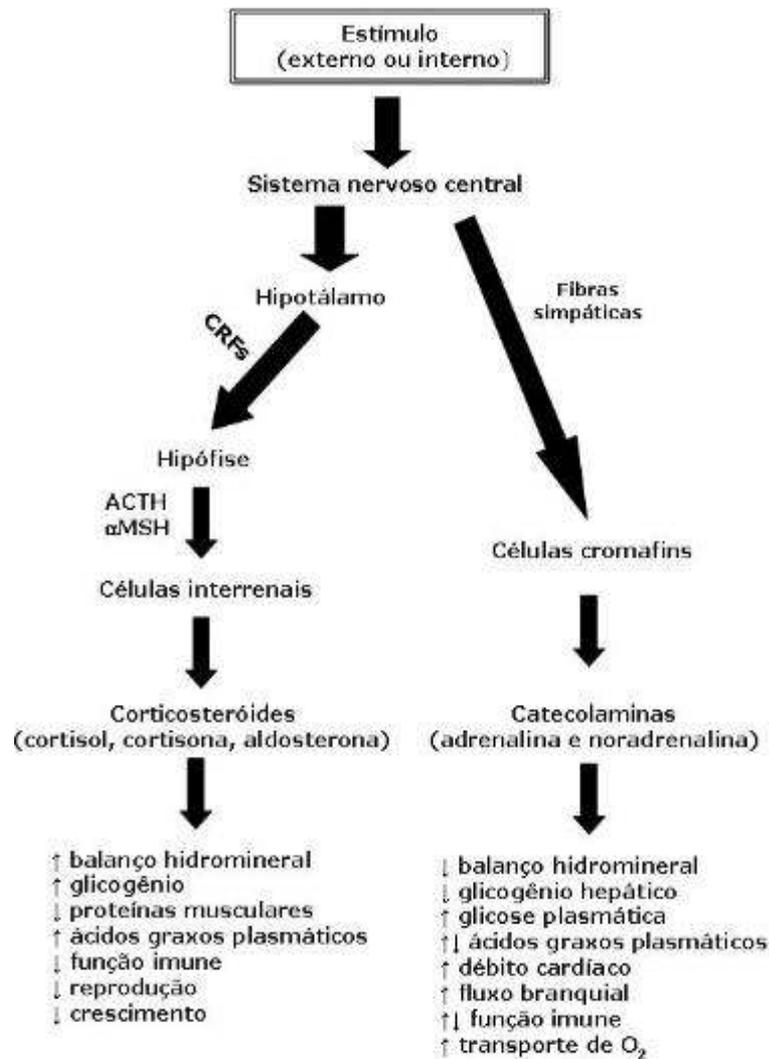


Figura 1. Efeitos primários e secundários ao estresse (Fonte: Wendelaar Bonga (1997)).

4.3 Resposta Terciária

A resposta terciária se caracteriza como uma fase de exaustão, quando os agentes estressores se tornam crônicos, comprometendo o desempenho, causando

mudanças no comportamento e susceptibilidade a doenças, alterando o sistema imunológico dos peixes, podendo levar a morte (COSTA et al., 2004).

5 Sistema Imune, Células e Funções em peixes.

O sistema imunológico dos peixes é dividido em inato (não específico) e adaptativo (específico). O sistema inato fornece a primeira linha de defesa, que consiste em impedir que os microrganismos tenham acesso aos organismos hospedeiro podendo eliminá-los ou bloqueá-los, prevenindo uma infecção. Já o mecanismo adaptativo depende da atividade dos linfócitos T e B, atuando na produção de imunoglobulinas específicas, atividade citotóxica e imunomodulação via citocinas, sendo eficientes contra infecção (MCGUINESS, et al., 2003; MEDZIHITOV, 2007)

Existem diferentes células de leucócitos descritos em peixes teleósteos sendo caracterizadas morfologicamente como: neutrófilos, monócitos, células B, eosinófilos, plasmócitos, células T e células “natural killer” (WHITE, 2007).

Pesquisas têm demonstrado que todos os tipos de leucócitos contribuem para a defesa do hospedeiro, podendo demonstrar três papéis importantes: os dois primeiros são os neutrófilos, juntamente com os monócitos e macrófagos que atuam digerindo as bactérias, restos celulares. Estas células são consideradas células fagocíticas, realizando várias outras funções coletivamente na reação protetora conhecida como resposta imunológica (PARSLOW, 2004; BARTON, et al, 2000).

Os fagócitos são as células primordiais do mecanismo celular não específico, sendo que, as células fagocíticas dos peixes são capazes de matar as bactérias por gerarem ânion de peróxido, peróxido de hidrogênio e radicais livres (BRANDÃO et. al., 2006).

As análises hematológicas são utilizadas na avaliação da saúde de peixes, podendo detectar mudanças fisiológicas ocorridas após fatores de estresse como alteração na qualidade da água, manejo e transporte (BALDISSEROTO et. al., 2008). O perfil hematológico é de extrema importância no diagnóstico de doenças em peixes, frente a agentes estressores. Desse modo, as respostas fisiológicas

podem ser avaliadas por meio de indicadores como cortisol, lactato, glicose e hematócrito durante o transporte (BRANDÃO et. al., 2006).

6 Transporte

O transporte de peixe é uma prática comum nas pisciculturas, expondo os peixes a diversos fatores adversos, ocasionando alterações metabólicas, hormonais, iônicas e hematológicas, caracterizando o estresse (WURTS, 1995). Se medidas adequadas e algumas precauções forem tomadas como os parâmetros do controle da qualidade da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia, dióxido de carbono) (Emata, 2000; Ross e Ross, 2008) e uma densidade apropriada de peixes acondicionados, pode-se reduzir a mortalidade de peixes durante o transporte (CARNEIRO e URBINATI, 2002).

A tolerância dos peixes durante o transporte está relacionada à habilidade dos peixes em adaptar-se a situações adversas, incluindo a captura, manuseio, carregamento e transporte, tornando o peixe susceptível a doenças (CARNEIRO, 2001).

De acordo com TAKAHASHI (2000), o transporte de peixe é inevitável, no entanto, existem protocolos a serem seguidos para reduzir o estresse. Alguns elementos contribuem na diminuição do estresse durante o transporte, como a utilização de anestésicos (INOUE, 2004).

7 Anestésicos para peixes derivados de plantas

Os anestésicos são utilizados na piscicultura com objetivo de facilitar o manejo e diminuir a mortalidade dos peixes. Diversos produtos químicos são utilizados como anestésicos em peixes, sendo a tricafina metanosulfato, a quinaldina e o 2-fenoxietanol (GIMBO, 2008).

Algumas substâncias químicas podem causar perda de muco, irritação da brânquia e danos da córnea, como é o caso da benzocaina (ethyl-paminobenzoato)

e o fenoxietanol (Inoue et. al., 2003) e podem ocasionar danos aos manipuladores e ao meio ambiente. No entanto, a busca por anestésicos de origem natural é estudada com intuito de viabilizar o manejo, diminuição da toxicidade aos manipuladores, enfim eficácia e praticidade no uso (AZIBA, BASS e ELEGBE, 1999)

A escolha do anestésico a ser utilizado no manejo e transporte na piscicultura deve seguir as seguintes recomendações: permitir duração razoável de exposição; produzir anestesia em três minutos ou menos e recuperação em menos que cinco; não apresentar toxicidade aos peixes durante o tratamento; não apresentar problema de segurança para mamíferos; produzir pouco resíduo, após período de depuração de uma hora ou menos e ter custo acessível (ROSS; ROSS, 2008).

A espécie *Lippia Alba* é conhecida como erva cidreira, incluindo aproximadamente 200 espécies de pequenos arbustos, medindo até dois metros de altura, com ramos finos de tonalidade branca, folhas variáveis e flores pequenas reunidas em inflorescências capituliformes pertencente à família Verbanacea (MATOS, 2000). Sua produção de biomassa e óleo essencial é autêntica e apresenta importância farmacológica, sendo utilizado nos programas de fitoterapia. A espécie é amplamente utilizada no Brasil devido às qualidades sedativas, espasmolítica suave, analgésica, ansiolítica e levemente expectorante (MATTOS et. al., 2007).

O nome popular “cidreira”, é empregado no Brasil com intuito de mencionar espécies aromáticas de várias famílias botânicas, entre elas a *Lippia alba*. Os aromas estão incluídos devido aos constituintes químicos como as misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas. A composição e concentração dos constituintes do óleo essencial é o resultado dos muitos processos metabólicos que ocorrem na planta (MATTOS et al., 2007), os quais podem variar em função das relações ecológicas da espécie com o meio, mudando continuamente com o tempo e o espaço (CASTRO et al., 2004).

Vários fatores ambientais podem influenciar o cultivo e a composição do óleo, devido a uma enorme variabilidade em relação à composição química dentro da espécie. Hennebelle et al. (2008) observaram ocorrência de sete componentes (quimiotipos) na espécie da erva-cidreira, cuja variabilidade foi identificada a partir do diagnóstico dos constituintes majoritários do óleo essencial.

Dentre os metabólitos secundários da *Lippia alba* estão os flavonoides, taninos, terpenóides, fenilpropanóides, geniposídeos (iridóides), saponinas

triterpênicas, açúcares, resinas e mucilagens. Enquanto entre os componentes do óleo essencial estão os monoterpenóides e os sesquiterpenóides (AGUIAR e COSTA, 2005).

Devido ao seu potencial farmacológico, pode ser classificada em diferentes quimiotipos I, II e III, apresentando variações morfológicas encontradas de acordo com a distribuição geográfica. Alguns estudos demonstram que, quando expostos ao mesmo ambiente, os quimiotipos conservam suas diferenças químicas e morfológicas que em grande parte é controlada geneticamente (VAL et al., 2006).

O óleo essencial de *Lippia alba* tem como componentes majoritários o citral, a carvona e o linalol, constituintes estes que são empregados como analgésico, sedativo e ansiolítico, assim como mucolítico e antimicrobiano (PASCUAL et al., 2001; LORENZI, 2002).

Com base nessas informações, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência sobre as respostas fisiológicas de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte do óleo essencial de *Lippia alba* Mill.

8 HIPÓTESE

O óleo essencial de *Lippia alba Mill* pode diminuir as respostas de estresse de alevinos de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte.

9 OBJETIVOS

9.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia alba Mill* no transporte de alevinos de surubim (*Pseudoplatystoma sp*).

9.2 Objetivo Específico

- Verificar a concentração necessária de óleo essencial de *Lippia alba Mill* no transporte de alevinos de surubim (*Pseudoplatystoma sp*);
- Verificar o efeito do óleo essencial de *Lippia alba Mill* sobre perfil hematológico;
- Verificar o efeito do óleo essencial de *Lippia alba Mill* sobre o perfil bioquímico;
- Verificar o efeito do óleo essencial de *Lippia alba Mill* sobre o perfil iônico;

10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, S. J.; URBINATI, E. C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 519-524, 2006.

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p. 79-84, 2005.

AZIBA, P.I.; BASS, D.; ELEGBE, Y. Pharmacological investigation of *Ocimum gratissimum* in rodents. **Phytotherapy Research**; v.1, n.5, p. 427-9, 1999.

BAGLIOLI, B. **Vitamina C na dieta e influência nas respostas de estresse e resistência de juvenis de jundiás expostos ao ictio**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; BRINN, R.P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternunlittorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to diferent Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, n.18, p.405-412, 2008.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTS, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIORENZA, I.; RODRIGUES, L.B.; SOSO, A.B.; RITTER, F.; CONRAD, J.; CERICATO, L.; FAGUNDES, M. & TERRA, S.R. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdiaquelen*, Quoy & Gaimards Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v.34, n.15, p.1465-1469, 2003.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v.1, p.3-26, 1991.

BARTON, B. A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C. R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns* x *S. platyrhynchus*) sturgeon exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.126A, n.253, p.124-134, 2000.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.517-525, 2002.

BEELEN, R.; BOYD, B.; GARAVELLO, J. C.; PAVANELLI, G.C.; AINSWORTH, A. J.A. Cytochemical, light and electron microscopic study of the peripheral blood leucocytes of hybrid surubim catfish (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Comparative Clinical Pathology**, v.12, n.2, p.61-68, 2003.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Resposta de estresse em pirarucu (*Arapaima giga*) durante prática de rotinas em piscicultura. **Acta Amazonica**, v.36, n.3, p.349-356, 2006.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATE, E. C.; **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae).** Jaboticabal, UNESP, p. 136, 2001 (Tese de Doutorado).

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C.; MARTINS, M. L. Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (*Osteichthyes, Characidae*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 555-560, 2002.

CARVALHO, C. S; FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v.251, p.109-117, 2006.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários.** Visconde do Rio Branco: UFV, 2ªed. p.113, 2004.

CASTRO, F. G.; FERNANDES, M. N. **Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismo de defesa inata em peixes cultivados.** In: **Tavares, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo.** Embrapa Macapá, p.602-624, 2009.

.CECH, J. J. R. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.125, p.308-320, 1996.

COSTA, O.F.T.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (*Serrasalminae*) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627-636, 2004.

EMATA, A. C. Live transporte of pond-reared milk fish *Chanos chanos* broodstock. **Journal World Aquaculture Society**, v.31, p. 279-238, 2000.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**. v. 35, n.1, p.71-75, 2005.

FILHO, E. B.; FIORUCCI, A. R. **A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos.** Química Nova na Escola, 2005.

GALHARDO, R.; OLIVEIRA, R. Bem-estar animal: um conceito legítimo para peixes? **Revista de Etologia**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 51-61, 2006.

GIMBO, R. Y.; SAITA, M. V.; GONÇALVES, A. F. N. TAKAHASHI, L. S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do Lambari do Rabo Amarelo (*astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.

GONÇALVES, A. F.; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, n.53, p.211-222, 2008.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS NETO, S.; MORAES, G. **Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*** (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 5, 2003.

INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Assessment of 2-phenoxyethanol and benzocaine as anesthetics for field procedures in matrinxã (*brycon cephalus*). **Biodiversidade Pampeana**, Uruguaiana, v. 2, p. 10-15, 2004

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994.

KEBUS, M. J.; COLLINS, M. T.; BROWNFIELD, M. S.; KAYES, T. B.; MALISON, J. A. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.4, p.1-6, 1992.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; MALISON, J. A.; BARRY, T. P.; HELD, J. A. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma sp.* **Journal World Aquaculture Society**, v.37, p. 89-95, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 4^a ed., v.1, 2002.

MARIANO, W. S. **Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju, *Hopleryrthrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil. p. 61-63, 2007.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201- 212. 1977

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. **Adrenergic responses to stress in fish**. In: PICKERING, A. D. *Stress in fish*. London: Academic Press, p. 49-75, 1981.

McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.W.; et al., (Eds): **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p.119-144, 1997.

MCGUINNESS, D. H.; DEHAL, P. K.; PLEASS, R. J. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. **Trends in Parasitology**, v.15, n.7, p.312-319, 2003.

MEDZHITOV, J. R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449, n.7164, p.819-826, 2007.

MILLIGAN, C. L. 2003. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss Walbaum*. **The Journal of Experimental Biology**, 206:3167-3173, 2003.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p. 211-268, 1999.

NOLAN, D. T. **Skin response of fish to stressors**. Tese (Doutorado) – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, 2000.

OBA, T. E.; MARIANO, S. W.; ROMAGUEIRA, L. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável**. Macapá: Embrapa, 2009

OLIVEIRA, R. F.; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 77-86, 2007.

PANKHURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 73-93, 1997.

PARSLOW, T.G. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Poor water quality suppresses the cortisol response in salmonid fish to handling and confinement. **Journal of Fish Physiology**, v.30, n.3 p.363-374, 1987.

PICKERING, A .D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, p.51-63, 1993.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T.G.; Biochemical effects of stress. In: Hochachka PW, Mommsen TP. **Environmental and Ecological Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, v.5, n.59, p.349-379, 1995.

POPP, G. L. **Sazonalidade de excreção de corticóides urofecais e sua relação com aspectos reprodutivos e de manejo em relação com aspectos reprodutivos e de manejo em papagaio de cara-roxa (Amazona brasiliensis) em cativeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3. Ed. Oxford: Blackwell Science, p.240, 2008.

SCHRECK, C. B. **Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors**. In: Pickering AD. (Ed.). *Stress and fish*. London: Academic, p. 295-321, 1981.

SCHRECK, C. B. Physiological, behavioural, and performance indicators of stress. **American Fisheries Society Symposium Series**, v.8, p.29-37, 1990.

SILVEIRA, S. U.; LOGATO, R. P.; PONTES, C. E. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 1001-1017, 2009.

TAKAHASHI, S. L.; ABREU, J. S.; BILLER, J. D.; URBINATE, E. C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 469-475, 2000.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em Piscicultura**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATE, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004.

VAL, A. L.; MENEZES, A. C. L.; FERREIRA, M. S.; SILVA, M. N. P.; ARAÚJO, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação**. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. Maringá: Abrapoa, p. 211- 228, 2006.

VAN DER BOON, J.; VAN DEN THILLART, G.; ADDINK, A. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology**, v.100, n.1 p.47-53, 1991.

WENDEELAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3 p.591-625, 1997.

WITHE, S. K. The innate immune response in finfish: a review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, n.6, p.1127-1151, 2007.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. New York: Chapman & Hall, 1996.

WURTS, W.A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26, p. 80-81, 1995.

CAPÍTULO ÚNICO

Influência do óleo essencial de *Lippia alba* sobre respostas ao estresse de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte¹

Essential oil of Lippia alba influence on stress responses of catfish (Pseudoplatystoma sp) submitted to transport

Vanessa Menegatti Marcondes², Tarcila Silva Castro⁴, Edsandra Chagas⁵, Juliana Rosa Carrijo Mauad³, Marcia Regina Russo³

ABSTRACT.- Vanessa Menegatti Marcondes, Tarcila Silva Castro , Edsandra C. Chagas, Marcia R. Russo 2014. [*Essential oil of Lippia alba influence on stress responses of catfish (Pseudoplatystoma sp) submitted to transport*] Influência do óleo essencial de *Lippia alba* sobre respostas ao estresse de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais., Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970 - Dourados, MS - Brasil - Caixa-postal: 533, vanessamenegattimarcondes@yahoo.com.br.

The transport of fish in aquaculture is an essential practice however this management promotes adverse reactions of fish, stress. This study evaluated the influence of essential oil of *Lippia alba* on stress responses of catfish (*Pseudoplatystoma sp*) submitted to transport in plastic bags for 4 hours. The experimental design was completely randomized (DIC) consisting of different concentrations of *Lippia alba* (0, 4, 8, 12, 16 mg L⁻¹) with three replications. 150 juvenile catfish *Pseudoplatystoma sp* were used. Mean body weight and length were 58.6 ± 9.2g and 17.3 ± 1.4 cm. Blood samples were taken in fish at the times: before shipping, after transport, 24h and 48h after transport in all treatments (n = 9) for evaluation of hematological, electrolytic (Na, K), plasma glucose and cortisol. The results were submitted to analysis of variance (P <0.05) and mean when significant were compared by Tukey test (P <0.05). The results showed no effect on the reduction of stress, although it decreased fish handling during transport. The concentrations used of *Lippia alba* promoted increased plasma glucose levels in surubins, however, cortisol, electrolyte balance and blood indexes, have not changed, demonstrating that the use of *Lippia alba* independent of dose served as stressor.

INDEX TERMS: hematology, cortisol, physiology, stress, glucose, transport

RESUMO: O transporte de peixes na aquicultura é uma atividade indispensável ao sistema de produção, no entanto este manejo promove reações adversas ao peixe ocasionando o estresse. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do óleo essencial de *Lippia alba* sobre respostas ao estresse de surubim (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte em sacos plásticos durante 4 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) constituído de diferentes doses de *Lippia alba* (0, 4, 8, 12, 16 mgL⁻¹) com três repetições. Foram utilizados 150 juvenis de surubim *Pseudoplatystoma sp* com peso 58,6 ± 9,2g e 17,3 ± 1,4 cm. Foram realizadas coletas de sangue nos peixes de cada tratamento (n=9), antes do transporte, depois do transporte, 24h e 48h após transporte, para avaliação dos parâmetros hematológicos, eletrolíticos (Na, K), glicemia e cortisol. Os resultados foram submetidos à análise de variância (P<0,05) e as médias quando significativas foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Os resultados não apresentaram efeitos na diminuição do estresse, apesar de ter diminuído a movimentação dos peixes durante o transporte. As concentrações utilizadas de *Lippia alba* promoveu aumento dos níveis de glicose plasmáticos nos surubins, entretanto, o cortisol, equilíbrio eletrolítico e os índices hematológicos, não foram alterados, demonstrando que o uso de *Lippia alba* independente da dose atuou como agente estressor.

² Universidade Federal da Grande Dourados, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970 - Dourados, MS - Brasil - Caixa-postal: 533, vanessamenegattimarcondes@yahoo.com.br, marciarusso@ufgd.br

³ Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciência Biológicas e Ambientais, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, CEP: 79804-970 - Dourados, MS - Brasil - Caixa-postal: 533, marciarusso@ufgd.br

⁴ EMBRAPA Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6 - Caixa Postal 449, CEP 79804-970 - Dourados, MS, tarcila@embrapa.br

⁵ EMBRAPA, Rodovia AM 010, km 29, Zona rural, CEP: 69010970 - Manaus, AM - Brasil - Caixa-postal: 319 edsandra@embrapa.br

TERMO DE INDEXAÇÃO: hematologia, cortisol, fisiologia, estresse, glicose, transporte

INTRODUÇÃO

Os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* compreendem os maiores peixes da família Pimelodidae são encontrados nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, como a Amazônica, a do Prata e do Paraguai (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Dentre as espécies utilizadas na piscicultura, destaca-se o surubim pelo seu valor de mercado (Sanchez et al., 2014). No entanto, devido seu hábito carnívoro há limitações de fases iniciais pelo canibalismo elevado. Especificamente no Estado de Mato Grosso do Sul, a produção desses bagres está representada pelo chamado surubim híbrido, fruto do cruzamento de fêmeas do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) com machos do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Crepaldi et al., 2006; Silva et al. 2013). Embora haja poucos estudos a respeito de suas vantagens em relação às espécies puras, tem sido os bagres mais produzidos no Estado.

O sistema de produção intensiva gera situações de estresse, as quais podem afetar o bem-estar e o sistema imunológico, ocasionando doenças e comprometendo a sobrevivência, (Inoue & Moraes, 2006). As respostas de estresse dividem-se em três estágios: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são as hormonais (catecolaminas e cortisol) as secundárias são as mudanças em parâmetros como glicose e íons no sangue e parâmetros hematológicos, e as terciárias estão relacionadas ao comprometimento do desenvolvimento e reprodução, às mudanças no desempenho e o aumento da susceptibilidade a doenças (Wendelaar Bonga, 1997).

Das diversas práticas de manejo efetuadas durante o cultivo, o transporte, quando realizado de maneira inadequada, pode promover mudanças na homeostasia dos peixes reduzindo a sobrevivência pós-transporte, ocasionando doenças e mortalidade dos peixes (Inoue et al., 2010). Sendo o manejo inevitável no processo produtivo, o transporte envolve o uso de sacos plásticos de alta densidade, expondo os peixes a uma série de estímulos que desencadeiam respostas fisiológicas de adaptação. Este sistema tem suas limitações, tais como um finito suprimento de oxigênio e o acúmulo de amônia e dióxido de carbono (Golombieski et al, 2003; Carneiro et al, 2009; Becker et al., 2012). Por essa razão, os piscicultores adicionam oxigênio puro aos sacos plásticos antes do transporte, o que pode causar variações nos níveis de oxigênio dissolvido, depleção da taxa metabólica, provocando rearranjo do fluxo sanguíneo e levando os peixes a usarem métodos mais eficazes de produção de energia (Nilsson e Renshaw, 2004). Desta forma, o uso de anestésicos parece facilitar e diminuir os efeitos estressantes do transporte, já que os peixes movimentam-se menos nas embalagens e consomem menos oxigênio e excretariam menos, diminuindo as chances de insucesso (Simões et al., 2012).

O uso de anestésicos no manejo de peixes deve promover, se utilizado em concentrações adequadas, a anestesia (imobilização) ou sedação eficiente, assim como a recuperação dos animais. Pois, caso os peixes sejam expostos aos anestésicos em concentrações muito elevadas e por tempo muito prolongado, o anestésico pode ser ainda mais prejudicial que a ausência do uso de qualquer produto. Ou seja, o próprio anestésico pode causar mortalidade (Iwama e Ackerman, 1994). Assim, o efeito dos anestésicos como redutor de estresse em peixes é controverso, uma vez que respostas ao próprio anestésico têm sido observadas em peixes expostos a Tricaina Metano Sulfonato (MS 222), óleo de cravo, metomidato, benzocaína, gás carbônico e fenoxietanol (Iversen et al., 2003; Pirhonen e Schreck, 2003; Wagner et al., 2003).

No Brasil são utilizados diversos anestésicos químicos no manejo de peixes tais como: a tricaina metano sulfato (MS-222), sulfato de quinaldina, benzocaína entre outros. No entanto, estes anestésicos podem ocasionar efeitos colaterais nos peixes, como perda de muco, irritação das brânquias e olhos (Inoue; Santos Neto; Moraes, 2003.), com isso, anestésicos naturais, extraídos de plantas, podem ser utilizados na substituição destes produtos por serem menos residuais e agressivos, além de apresentarem baixa toxicidade (Inoue, et al., 2011).

A erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] é uma planta de importância farmacológica, com ampla utilização nos programas de fitoterapia. A espécie é largamente utilizada no Brasil devido às propriedades calmante, espasmolítica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e levemente expectorante em seres humanos. Em vista disto, foi estudado o efeito do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE (Verbenaceae) como anestésico em jundiás (*Rhamdia quelem*) (Cunha et al., 2010; Heldwein et al., 2012) e cavalo-marinho delgado *Hippocampus reidi* na água de transporte. Seus resultados demonstraram eficácia na diminuição dos níveis de cortisol e glicose plasmáticos após o transporte e estresse de manejo. (Cunha, et al., 2011).

Apesar da difusão do uso de saco plástico para o transporte de peixes, as mudanças na qualidade de água associadas ao tempo de permanência neste recipiente podem promover alterações fisiológicas deletérias levando ao peixe a óbito. Com isso a utilização de substâncias mitigadoras de efeito de estresse pode ser uma alternativa para o transporte de peixe. Neste cenário destaca-se a óleo essencial de *Lippia*

Alba pelo seu baixo custo, fácil acesso e baixa toxicidade (Azambuja et al, 2011; Cunha et al, 2011; Becker et al, 2012).

Com base nestas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas de alevinos do surubim híbrido (*Pseudoplatystoma sp*) submetidos ao transporte com diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia alba* Mill.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados-MS. Foram utilizados 150 juvenis de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma sp*) com peso $58,6 \pm 9,2$ g e comprimento $17,3 \pm 1,4$ cm, adquiridos em uma piscicultura comercial na cidade de Terenos-MS. O óleo essencial de *Lippia alba* foi cedido pelo Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental.

Antes do transporte os peixes permaneceram em jejum vinte e quatro horas. Para o acondicionamento dos peixes foram utilizados 15 sacos plásticos de alta densidade com capacidade de 60L supridos com 20L de água, e posteriormente colocados 10 peixes em cada saco e adicionadas soluções de *Lippia alba*, sendo quatro tratamentos e um grupo controle: 0, 4, 8, 12 e 16 mg L⁻¹. Os sacos foram identificados de acordo com a solução adicionada, sendo 3 sacos (triplicata) adicionados a mesma concentração da solução de *Lippia alba*. Foi adicionado oxigênio puro e os sacos foram imediatamente lacrados. A solução de *Lippia alba* foi preparada de acordo com as diferentes doses e a densidade do óleo de 1g/mL, sendo 5 mL diluídos em 100 mL de etanol absoluto resultando numa solução “mãe” contendo aproximadamente 50 mg de óleo para cada ml de etanol - 50 mg L

O transporte foi realizado em rodovia durante 4 horas. Durante o experimento foram realizadas quatro coletas de sangue: na piscicultura antes do transporte (AT); após 04h horas de transporte (logo após a abertura do saco de transporte); 24h e 48h após o transporte (DT).

Logo após o término do transporte, os peixes foram acondicionados em caixas d’água de 350 litros e aeração constante para a realização dos testes de cada concentração. Os tanques experimentais foram numerados aleatoriamente em quatro tratamentos com três repetições cada, sendo: concentração 0, estresse de transporte sem nenhum óleo diluído na água 1) estresse de transporte sob concentração 4 mg L⁻¹; 2) estresse de transporte sob concentração 8 mg L⁻¹; 3) estresse de transporte sob concentração 12 mg L⁻¹ e 4) estresse de transporte sob concentração 16 mg L⁻¹. Ao longo do experimento foram realizadas quatro coletas de 9 animais de cada tratamento: a) antes do transporte, b) após 4 h de transporte c) após 24 h e d) após 48 h.

Para as medidas dos parâmetros bioquímicos em cada tratamento foram coletados 3 peixes por caixa, sendo esses sacrificados de forma instantânea por depressão cerebral (Canadian Council on Animal Care - CCAC, 2003). A cada tempo de coleta (AT; DT; 24 h e 48H) foram coletadas amostras de sangue mediante a punção de vasos caudais com o auxílio de seringas de 3 ml e agulha 25x0,7, sem a presença de anticoagulante, nos momentos antes do transporte (AT), depois do transporte (DT; logo após a abertura do saco de transporte) e 24 e 48 horas depois do transporte (24DT e 48DT); O sangue foi centrifugado a 12000g por 3 minutos para obtenção de soro.

Das amostras de soro foram avaliadas a glicose plasmática pelo método enzimático (Tavares-Dias e Moraes, 2004), utilizando-se o reagente comercial Glicose PAP Liquiform cat. 84 da Labtest Diagnóstica®, Lagoa Santa- MG; o cortisol, pela técnica de Quimiluminescências (Eduards, 1999) e os níveis eletrolíticos através de aparelho automatizado Íons Eletrólitos WE-300 (Fernandes e Kubota, 2001).

Os parâmetros hematológicos determinados foram: hematócrito (Ht), a concentração de hemoglobina (Hb) e o número de eritrócitos. Para determinação do número de eritrócitos foi utilizado o hemocítmetro (câmara de Neubauer), com diluição em pipetas de Thomas. O líquido de Hayen foi utilizado como diluente para contagem de eritrócitos. A determinação do hematócrito foi obtida utilizando-se uma centrífuga de microhematócrito (Fanem modelo 210 IEC®) e a leitura feita em cartão a do fabricante, de acordo com Mello (2005). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina, empregando-se o líquido de Drabkin (Doles®) e a leitura realizada em espectrofotômetro (Espectrophotometer digital UV-VIS, Coleman 395-D®). As constantes corpusculares, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculadas utilizando-se os resultados determinados na série vermelha, conforme Birgel (1982) e Mello(2005).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey para comparação das médias, com adoção do nível de confiança (p<0,05)

(Graph Pad InStat Version 3.0, win 95/NT, 1997). A análise de variância foi feita a partir das medidas repetidas no tempo para verificação das respostas metabólicas do surubim ao longo do experimento.

Durante os ensaios foram monitorados os parâmetros de qualidade de água antes do transporte e após o transporte (4 horas), sendo a temperatura, oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica, com o multiparâmetro US50 HORIBA, e a amônia total pelo método de endofenol (alfa Kit), pelo método descrito por Golterman et. al, 1978.

RESULTADOS

Não foram observadas mortalidade dos peixes em qualquer tratamento ao longo do transporte e pós transporte. Após o período de transporte os níveis de cortisol não foram alterados entre as diferentes concentrações de tratamento (Figura 2A). Após 04h de transporte, a concentração basal de glicose plasmática em torno de 58 mg/dL, aumentou para 70 mg/dL em todos os grupos amostrados, com retorno aos valores basais após 24h e 48h (Figura 3B e 4B). O cortisol plasmático nos peixes submetidos a 04h de transporte aumentou de aproximadamente 3,3 µg/dL (antes do transporte) para 6,5 µg/Dl após 4 horas de transporte, independentemente da presença de *Lippia alba*. (Figura 2A). Após 24h e 48h não houve alteração de cortisol, mantendo-se semelhantes ao controle (Figura 3A e 4A).

Não foram observadas alterações nos parâmetros eletrolíticos e nos índices hematológicos dos alevinos de surubim submetidos a diferentes doses de óleo da *Lippia alba* no transporte, mostrando resultados semelhantes aos do controle (Quadro 1).

A temperatura da água variou pouco durante o experimento, sendo a média de 25,8±0,1°C. Os teores de amônia 11,4±6,3mg/L, oxigênio dissolvido 12,9±3,2 mg/L e pH 5,9±0,2 apresentaram elevados após 4 horas de transporte, independente da presença de *Lippia alba* Mill. (Quadro 2).

DISCUSSÃO

Geralmente, anestésicos causam uma depressão do centro sistema nervoso pela interrupção do potencial de ação dos axônios, liberação de neurotransmissores, a excitabilidade da membrana ou uma combinação de todas estas ações (Ross e Ross, 2008). No entanto, no presente estudo, o uso de óleo essencial de *Lippia alba* Mill, independente da concentração, aumentou os níveis de glicose plasmáticos e manteve normal os níveis de cortisol nos alevinos de surubim. As reações fisiológicas ao estresse podem perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à sua saúde e bem-estar (Davis, 2006). Tal dinâmica pode reduzir consideravelmente a capacidade de desempenho do peixe tanto durante a fase de reestabelecimento tanto frente a um estresse agudo quanto ao estresse crônico (Mommsen et al., 1999).

Após a percepção de um estímulo adverso pelo sistema nervoso central, catecolaminas e cortisol são liberados na corrente sanguínea. Estudos em estresse de peixes associam o aumento das concentrações do cortisol em resposta a estímulos adversos (Barton, 1997), estabelecendo-se assim a importância do eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal na dinâmica e controle das alterações fisiológicas do estresse, o qual os peixes experimentam frente a diversos fatores adversos (Mommsen et al., 1999). Mazeaud et al. (1977) classificou as respostas de estresse em primárias, secundárias e terciárias, sendo as primárias os efeitos que ocorrem no sistema endócrino, e as secundárias as alterações metabólicas e osmorregulatórias. Dessa forma, os peixes ao perceberem diferentes estressores através do sistema nervoso central desencadeiam as reações fisiológicas ao estresse, primeiramente em nível hormonal pela liberação na corrente sanguínea das catecolaminas (aumentando a frequência cardíaca e respiratória) e do cortisol pelas células cromafins e inter-renais, respectivamente. Logo, as relações entre os efeitos fisiológicos de determinado estressor e o aumento da concentração do cortisol plasmático quantificam a intensidade do estresse, que estudado em conjunto com as respostas secundárias como a hiperglicemia, é interpretada como a solicitação de energia extra pelo organismo (principalmente por glicogenólise das reservas musculares e hepáticas), para que o possa se adaptar à determinada condição adversa (Hattingh, 1976).

A concentração de cortisol plasmático tem como características em peixes que sofrem estresse crônico a elevação dos seus níveis podem permanecer elevada por longos períodos, no entanto em situações de estresse agudo os valores basais retornam em aproximadamente 6 horas (Wendeelar-Bonga, 1997). Estudos demonstraram que a resposta de juvenis de surubim *Pseudoplatystoma sp.* a estressores agudos o cortisol é atingido em 30 minutos após o desafio (Barry et al., 1993; Head e Malison, 2000). Estes resultados sugerem que o surubim é uma das espécies de peixe que apresenta maior resistência ao estresse (Lima et al., 2006). No entanto, observou-se que no presente trabalho não houve alteração nos níveis de cortisol, o que sugere que os níveis de catecolaminas podem não ter sido alterados pelo estresse quando na presença do óleo de *Lippia alba*.

Segundo Inoue et al. (2011) a transferência dos peixes de local provoca estímulos adversos suficientes para iniciar as respostas metabólicas ao estresse, resultando em aumento da glicose do plasma. Esses aumentos são interpretados de forma que o cérebro detecte um ou mais estímulos adversos, sendo dois eixos metabólicos ativados: CPI (cérebro-pituitária-inter-renais) e CSC (cérebro, células simpáticas de cromafins).

A glicemia, uma das respostas fisiológicas mais utilizadas como indicador de estresse em peixes, foi elevada, caracterizando estresse durante o transporte, para atender a demanda metabólica e elevar o metabolismo energético em situações de fuga ou adaptação da espécie a condição estressante (Sanches, 2014). A glicose é armazenada como glicogênio hepático com a finalidade de promover energia para o metabolismo. A concentração da glicose nos peixes varia no decorrer do dia devido ao regime alimentar e por mudanças climáticas e de manejo. O metabolismo de glicogênio nos peixes está relacionado as necessidades de glicose atendidas, principalmente por meio da gliconeogênese (a partir de substratos como lactato, piruvato e aminoácidos). As reservas de glicogênio encontram-se no fígado e nos músculos dos peixes e são mobilizadas para atender às necessidades energéticas, que aumentam principalmente sob condições estressantes, seja no ambiente natural, altas densidade de estocagem, manejos, captura e transporte (Barton, 1997). A hiperglicemia está relacionada ao estresse e mediada pelos efeitos das catecolaminas e da liberação de glicogênio hepático e muscular, na tentativa de prover energia extra para o organismo. É possível inferir que as concentrações de *Lippia alba* utilizada no transporte se mostraram ineficientes na glicose plasmática durante e após 04 horas de transporte, restabelecendo 24 e 48h a homeostase inicial do estudo, de acordo com grupo controle que também passou pelo mesmo manejo não apresentando elevação da glicose plasmática (Weendelar Bonga, 1997).

Efeitos no balanço eletrolítico são também evidências das respostas secundárias do estresse, visto que por ação de estressores os peixes apresentam circulação sanguínea e batimentos operculares alterados (por ação das catecolaminas). Assim, a relação de contato sangue-água nas brânquias muda, de forma que os peixes não encontram condições fisiológicas ideais para manter o seu equilíbrio iônico com o ambiente por difusão. As mudanças osmo-regulatórias são principalmente notadas através das variações nos teores plasmáticos de íons sódio e potássio (McDonald e Milligan, 1997). No presente estudo não houve alteração dos parâmetros eletrolíticos antes do transporte, após horas de transporte, 24h e 48h, sendo que as alterações iônicas estão relacionadas a elevação dos níveis de cortisol que juntamente com hormônios hipofiseal e extrahipofiseal controlam a atividade osmorregulatória em peixes, o que não ocorreu, pois, os níveis de cortisol não alteraram durante todo o estudo.

Os parâmetros hematológicos em peixes são susceptíveis às alterações de acordo com mudanças do ambiente aquático, podendo propiciar patologias e comprometimento na saúde (Tavares e Moraes, 2004). Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos nos peixes analisados. Os resultados sugerem maior resistência dos indivíduos jovens do surubim híbrido ao estresse de transporte, ou condições estressantes, já que não foi observada ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, que pode ser decorrente do aumento do consumo de oxigênio, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética e/ou de liberação de eritrócitos pelo baço. Por outro lado, as mudanças nas respostas hematológicas de estresse, normalmente não são observadas em exposições agudas, e sim nas exposições crônicas devido a disfunção osmorregulatória (Morales et al., 2005). Os resultados apresentados indicaram o estresse agudo, pois não houve alteração nos índices hematológicos, eletrolíticos e cortisol plasmático, por outro lado, Inoue et al. (2003) destaca que é necessário o peixe perder totalmente a percepção para que o cortisol não apareça como resposta ao estresse atingido o estágio II e III de grau anestesia, o que não foi observado no presente estudo. Possivelmente, todas as concentrações de *Lippia alba* adicionadas a água de transporte (4, 8, 12 e 16 mg L⁻¹), foram elevadas, embora não tenha atenuado as respostas cortisolêmicas e conseqüentemente a concentração dos metabólitos que o acompanham para atender a demanda energética aumentada. Desse modo, para esta condição não houve redução do estresse durante o transporte. Resultados semelhantes foram verificados com anestésico benzocaína, apresentando pouco efeito preventivo ao estresse no transporte de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*), não diminuindo o estresse durante o transporte (Carneiro e Urbinati, (2001) e Inoue et al., (2005).

Para cavalo marinho (*Hippocampus*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) o óleo de *Lippia alba* foi eficaz na água de transporte, inibindo a elevação do cortisol plasmático e glicose após o estresse de manejo, sendo seu uso sugerido para as espécies (Cunha, et al.,2010). No entanto, neste estudo foram utilizadas doses menores (15 µL/L) durante o manejo, o que não ocorreu no presente trabalho. Possivelmente diferenças individuais da espécie, além da maior dosagem utilizada podem ter levado aos resultados encontrados.

Em relação aos resultados das variáveis físico-químicas da água, a alta taxa de adensamento nas embalagens foi o fator que predispôs ao aumento de amônia na água do transporte, pois os peixes para manter seus níveis adequados de excreção nitrogenada por difusão, devido a alterações dos batimentos

operculares e da circulação sanguínea, mudam a relação entre o sangue e a água nas brânquias, ocasionando um déficit de oxigênio nos peixes, excretando assim a amônia para atender a demanda energética. A diminuição do pH, foi observada devido ao efeito do gás carbônico liberado pela respiração dos animais durante o transporte, o que pode ter sido ocasionado pelo tempo de transporte em que o animal permaneceu na água sem renovação. Os teores altos de oxigênio dissolvido foram devidos à injeção de oxigênio puro nas embalagens do transporte, aparentemente não prejudiciais aos peixes. É provável que o uso do anestésico tenha contribuído com um menor consumo de oxigênio, o que manteve os valores ainda mais altos de oxigênio nesses grupos (Inoue et al.,2010).

O uso de anestésico de *Lippia alba* se mostrou ineficiente na redução de glicose durante e após o transporte, sendo provável que as concentrações de *Lippia alba* utilizadas neste trabalho, não tenha sido suficiente para prevenir os distúrbios ocasionados pelo estresse de transporte.

CONCLUSÃO

A utilização de óleo de *Lippia alba* no transporte de alevinos do surubim *Pseudoplatystoma sp* não apresentou efeito benéfico ao estresse, portanto não sendo recomendado seu uso nas concentrações avaliadas.

O estudo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biossegurança e ética. Processo 003/2014 CEUA/UFGD.

REFERENCIAS

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

Barton, B.A, 1997. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In Iwama, G.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (Eds). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press 1-34.

Barry, T.P.; Lapp, A.F.; Kayes, T.B.; Malison, J.A., 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*, 117:351-366

Becker, A. G., T. V. Parodi, C. G. Heldwein, C. C. Zeppenfeld, B. M. Heinzmann & B. Baldisserotto. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 789-796

Birgel, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. *Patologia clinicaveterinária*,1982. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo 2: 2-34.

Buitrago-Suarez, I.A.; Burr, B.M. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Beker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eighth species. *Zootaxa*, 1-38 p.

Carneiro, P. C. F.; Urbinati, El. C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther) during transport. *Aquaculture Research*. 32 : 297-304.

Carneiro, P. C. F., P. H. S. Kaiseler, E. A. C. Swarofsky & B. Baldisserotto. 2009. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. *Neotropical Ichthyology*, 7: 283-288.

Crepaldi, D. V.; FARIA, P. M. Teixeira, E.A.; Turra, E. M.; Queiroz, B.M. 2006. O surubim na aquicultura do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 30 (3/4): 150-158.

Cunha, M.A.; Barros, C.M.F.; Garcia, L.O.; Veeck, A.P.L.; Heinzmann, B.M.;Loro, V.L.; Emanuelli, T.; Baldisserotto, B. 2010. Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306: 403-406.

Cunha, M. A., B. F. Silva, F. A. C. Delunardo, S. C. Benovit, L. C. Gomes, B. M. Heinzmann & B. Baldisserotto. 2011. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*, 9: 683- 688.

- Davis, K. 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, 68 :116-121.
- Golombieski, J. I., L. V. F. Silva, B. Baldisserotto & J. H. S. da Silva. 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture*, 216: 95-102.
- Golterman, H.L.; Clymo, R.S.; Ohnstad, M.A.M. 1978. Methods for physical and chemical analysis of freshwaters. (I.B.P. Handook, 8). Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.213.
- Head, A.; Malison, J., 2000. Effects of lighting spectrum and disturbance level on the growth and stress responses of yellow perch *Perca flavescens*. *Journal World Aquaculture Society*, 31:73-80
- Hattingh, J. 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater *Labeo capensis*. *Journal of Fish Biology*, 10:191-195.
- Heldwein, C. G., L. L. Silva, P. Reckziegel, F. M. C. Barros, M. E. Bürger, B. Baldisserotto, C. A. Mallmann, D. Schmidt, B. O. Caron & B. M. Heinzmann. 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45: 436-443.
- Inoue, L. A. K. A.; Santos Neto, C.; Moraes, G. 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Bryconcephalus* (Gunther, 1869). *Ciência Rural*, 33: 943-947.
- Inoue L.A.K.A.; Afonso L.; Iwama G. Moraes G. 2005. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazonica*, 35 (2):145-151.
- Inoue, L.A.K.A.; Moraes, G. 2006. Stress of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport in plastic bags. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1(1):1-9.
- Inoue, L. A. K. A.; Hackbarth, A.; Moraes, G. 2010. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. *Revista Brasileira Saúde Prod. An.* 11 (3):909-918.
- Inoue, L. A. K.; Boijink, C. L.; Ribeiro, P. T.; Silva, A.M.D.; Affonso, E.G. 2011. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amazonica*. 41 (2): 327-332.
- Iwama, G.; Ackerman, A. Anaesthetics. In. HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, T. (Eds.), 1994. *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, p.1-15.
- Iversen, M.; Finstad, B.; Mckinley, D.; Eliassen, R. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221: 549-566.
- Lima, L.C.; Ribeiro, L.P.; Malison, J.A.; Barry, T.P.; Held, J.A., 2006. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma* sp. *Journal World Aquaculture Society*, 37: 89-95
- McDonald, G.; Milligan, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress, p. 119-144. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds). 1997. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University press.
- Mazeaud, M.M.; Mazeaud, F.; Donaldson, E.M. 1977. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data With a General Review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- Mello, M.H. N-acetilcisteína e dapsona: avaliação da toxicidade hematológica e bioquímica em ratos Wistar. 2005. 103p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Programa de Pós-graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo.
- Mommsen T.; Vijayan M.; Moon T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9:211-268.
- Morales, A. E.; Cardenete, G.; Abellán, E.; García-Rejón, L. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*. 36(1): 33-40.
- Nilsson, G. E. & G. M. C. Renshaw. 2004. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology*, 207: 3131- 3139
- Pirhonen, J.; Schreck, C.B. 2003. Effects of anesthesia with MS 222, clove oil and CO2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220(1): 507-514.

Ross, L.G.; Ross, B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.3. Ed. Oxford: Blackwell Science, p.240.

Sanchez, M. S.S.S.; Rodrigues, R.A.; Nunes, A.L.; Oliveira, A.M.S.; Fantini, L.E.; Campos, M.C. 2014. Respostas fisiológicas de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a anestésicos naturais. Semina: Ciências Agrárias. 35(2):1061-1070.

Simões, L. N.; Gomide, A. T. M.; Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L.; Gomes, L. C. 2012. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum. Animal Sciences. 34(2): 175-181.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p.

Wagner, G.; Woody, C.A.; Nelson. 2003. The ability of clove oil and MS222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Research, (34): 1139-1146.

Wendeelar Bonga, S. E. The stress response in fish.1997. Physiological Reviews.3:591-625.

Legendas das figuras

Fig. 2 - Cortisol (A) e glicose (B) (média \pm DP) em *Pseudoplatystoma sp* após 4 horas de transporte com óleo essencial de *Lippia alba Mill.* Valores com letras distintas reportam diferença estatística pelo teste de tukey ($P > 0,05$)

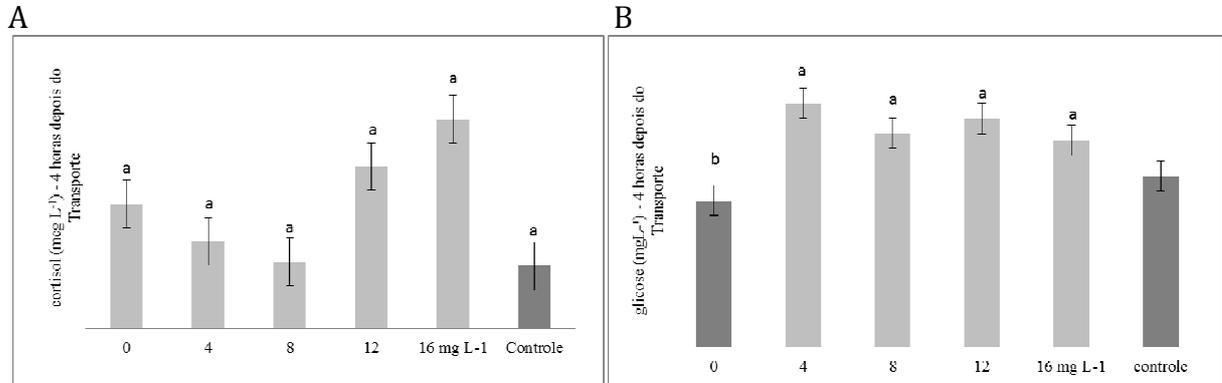


Fig. 3- Cortisol (A) e glicose (B) (média \pm DP) em *Pseudoplatystoma sp* após recuperação de 24 horas ao transporte com óleo essencial de *Lippia alba Mill.*

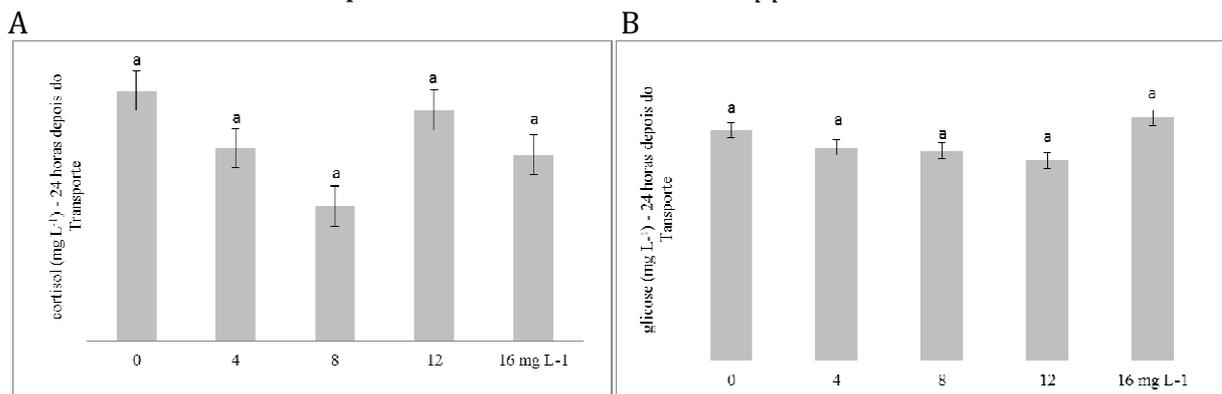
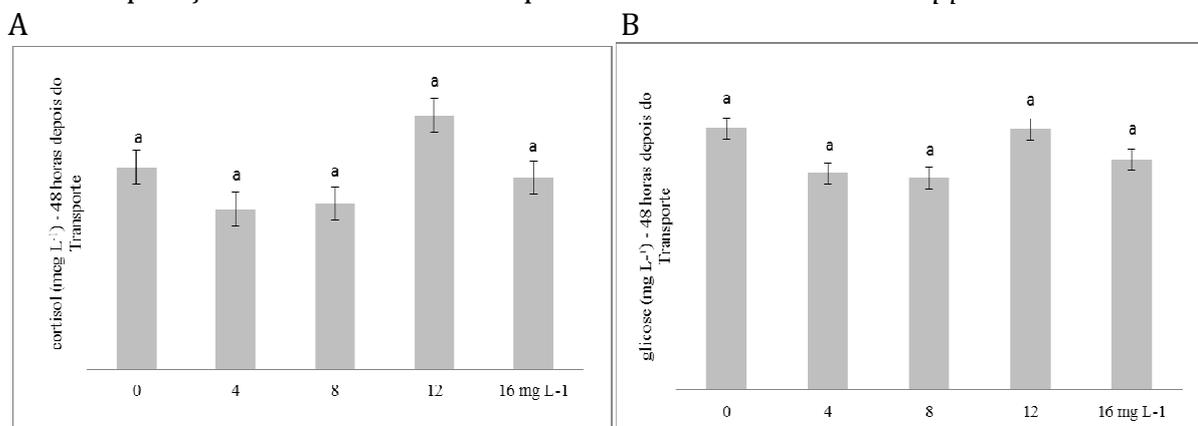


Fig. 4- Cortisol (A) e glicose plasmática (B) (média \pm DP) em *Pseudoplatystoma sp* após recuperação de 48 horas ao transporte com óleo essencial de *Lippia alba Mill.*



Quadro 1- Eletrólitos e índices hematológicos de surubim após serem submetidos ao transporte.

		mg L ⁻¹ <i>Lippia Alba</i>					
		0	4	8	12	16 mg L ⁻¹	Controle
Eletrólitos							
Na ⁺		140,4 ± 2,4	140,0 ± 3,5	142,3 ± 3,2	143,5 ± 2,1	144,1 ± 2,1	140,1 ± 2,3
K ⁺		2,6 ± 0,7	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,4	3,7 ± 0,7	2,6 ± 0,7	2,4 ± 0,3
Hemograma							
RDC		2,7 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,8 ± 0,4	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1	2,5 ± 0,7
Hto		41,1 ± 1,5	36,7 ± 4,2	36,9 ± 2,5	37,7 ± 3,3	36,3 ± 3,2	41,1 ± 1,6
Hb		12,2 ± 1,1	11,6 ± 1,6	11,3 ± 1,4	11,5 ± 1,0	11,1 ± 0,8	12,0 ± 1,0
VCM		89,4 ± 0,7	89,2 ± 0,8	89,6 ± 0,7	89,4 ± 0,7	89,4 ± 0,7	89,2 ± 0,8
HCM		27,1 ± 3,5	28,6 ± 2,7	26,4 ± 1,4	27,6 ± 2,3	27,1 ± 3,5	28,6 ± 2,7
CHCM		30,1 ± 4,0	31,7 ± 3,0	29,3 ± 1,5	30,6 ± 1,7	30,7 ± 2,5	31,7 ± 3,0

Quadro 2. Variáveis físicas e químicas da água após 4h de transporte em sacos plásticos sob influência da *Lippia alba* Mill

	T°C	O.D (mg/l)	pH	NH4 (mg/l)
Tratamentos				
Controle	26,0 ± 0,2	7,9 ± 0,3 ^a	7,4 ± 0,02 ^a	0,4 ± 0,02 ^a
0 mg/L <i>L.alba</i>	25,8 ± 0,2	11,9 ± 4,0 ^b	5,9 ± 0,2 ^b	12,0 ± 3,9 ^b
4 mg/L <i>L.alba</i>	25,8 ± 0,2	14,2 ± 1,3 ^b	5,9 ± 0,2 ^b	14,2 ± 1,3 ^b
8 mg/L <i>L. alba</i>	25,7 ± 0,1	14,3 ± 1,3 ^b	5,9 ± 0,2 ^b	14,2 ± 1,3 ^b
12 mg/L <i>L. alba</i>	25,7 ± 0,1	16,2 ± 2,7 ^c	5,9 ± 0,2 ^b	16,2 ± 2,7 ^c
16 mg/ L <i>L. alba</i>	25,7 ± 0,1	16,2 ± 2,7 ^c	5,9 ± 0,2 ^b	16,2 ± 2,7 ^c

Dados apresentados com suas médias ± desvio padrão. Controle verificado antes do transporte; e mais valores após 4h de transporte. 0mg/L, 4mg/L, 8 mg/L, 12 mg/L e 16 mg/L correspondem às concentrações de *Lippia alba* Mill utilizadas na água de transporte. T °C= temperatura; O.D. = oxigênio dissolvido; NH4 = amônia. Letras sobrescritas diferentes significam diferenças (P<0,05) entre os grupos.

11 CONCLUSÃO GERA

O sucesso na aquicultura, principalmente na criação de peixes, está intimamente ligado a avanços científicos desenvolvidos na biologia, no manejo ambiental e no ciclo de produção. O desenvolvimento e crescimento dos peixes podem ser afetados por uma série de fatores tais como: doenças oportunistas, problemas fisiológicos e deficiência no sistema imunológico, sendo atribuída às práticas de manejo inadequadas as principais causas de estresse, fator esse que, embora comum, seja difícil de controlar e que pode afetar o desempenho produtivo pelo aumento da susceptibilidade a doenças.

O óleo essencial de *Lippia Alba* foi utilizado neste estudo com a finalidade de ser uma alternativa viável como substância anestésica no transporte de peixes, por existir estudos que comprovem sua eficácia em outras espécies como o cavalo marinho e jundiá. No entanto, as concentrações utilizadas de *Lippia alba* não foram eficazes na redução do estresse no transporte de alevinos do surubim neste estudo, conforme os resultados apresentados, não sendo recomendado seu uso nas concentrações avaliadas.

ANEXO I

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA – ISSN – 0100-736X)

(Brazilian Journal of Veterinary Research)

Conselho Editorial:

Editor-Geral: Jürgen Döbereiner (CBPA), Seropédica, RJ (jorgen.dobereiner@pvb.com.br).

Consultor para versão online: Piotr Trzesniak (Unifei), Itajubá, MG,

(piotrze@gmail.com).

Print ISSN: 0100-736X

Online: 1678-5150

Fator de Impacto: 0,510

Política Editorial

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (Brazilian Journal of Veterinary research) <http://www.pvb.com.br>, revista bilingüe editada pelo Colégio Brasileiro de Patologia Animal (CBPA), publica desde 1981, inicialmente com periodicidade trimestral, trabalhos originais de contribuição científica no campo da patologia veterinária lato sensu, principalmente sobre doenças de animais de produção, incluindo epidemiologia, estudos populacionais e métodos de diagnóstico. A partir do 27o volume (2007), em parceria com o Colégio Brasileiro de Anatomia Animal (CBAA) e, durante dois anos, com duas outras associações científicas veterinárias (Anclivepa-SP e ABOV), a revista passa a ser de periodicidade mensal publicando resultados de pesquisa, em fascículos específicos, sobre Animais de Produção/Livestock Diseases, Pequenos Animais/Small Animal Diseases e sobre Morfofisiologia/Animal Morphophysiology. Em 2008, a Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens (Abravas) começou a fazer parte da parceria com a edição de fascículos sobre Animais Selvagens/Wildlife Medicine. Na preparação dos originais, os autores devem seguir os moldes de apresentação da revista, explícitos nas "Instruções aos Autores" opção "Submissão de artigos" do site (<http://www.pvb.com.br/>). Os trabalhos submetidos serão aceitos para publicação através da tramitação entre os pares.

Na preparação dos originais, os autores devem seguir os moldes de apresentação da revista, explícitos nas "Instruções aos Autores" opção "Submissão de artigos" do site (<http://www.pvb.com.br/>). Os trabalhos submetidos serão aceitos para publicação através da

tramitação entre os pares.

A revista está indexada em: SciELO - Scientific Electronic Library Online (www.scielo.br/pvb); ISI/Thomson Reuters, em seus produtos Science Citation Index Expanded e BIOSIS Previews; CABI, nas bases-chaves CAB Abstracts e Global Health e em várias bases derivadas, como: Animal Science Database e VetMedResources.

Submissão de artigos para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira

A revista bilíngüe é de periodicidade mensal, publicando resultados de pesquisa sobre Doenças de Animais de Produção/Livestock Diseases, Pequenos Animais/Small Animal Diseases, Morfofisiologia/Animal Morphophysiology e Animais Selvagens/Wildlife Medicine.

Está indexada nas seguintes bases de dados: SciELO, Scientific Electronic Library Online; ISI/Thomson Reuters, em seus produtos Science Citation Index Expanded e BIOSIS Previews; CABI, nas bases-chaves CAB Abstracts e Global Health e em várias bases derivadas, como: Animal Science Database e VetMedResources (para internet), Index Veterinarius e Veterinary Science Database (bases de resumos) e Veterinary Bulletin (impresso), DOAJ, Directory of Open Access Journals (<http://www.doaj.org>).

É classificada como "nível A internacional" pela CAPES e possui um dos melhores fatores de impacto entre as revistas da área de medicina veterinária no país.