

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**Efeito Anestésico e Toxicidade Aguda do Óleo Essencial de *Citrus sinensis*
em *Betta splendens***

Rafael Carvalho da Silva

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Efeito Anestésico e Toxicidade Aguda do Óleo Essencial de *Citrus sinensis*
em *Betta splendens***

Rafael Carvalho da Silva

Sob a Orientação do Professor

Leonardo Rocha Vidal Ramos

e Coorientação do Professor

Marcelo Maia Pereira

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal no
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Área de Concentração
em Zootecnia.

Seropédica, RJ

Outubro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586e Silva, Rafael Carvalho da , 1993-
Efeito anestésico e toxicidade aguda do óleo
essencial de *Citrus sinensis* em *Betta splendens* /
Rafael Carvalho da Silva. - Seropédica, 2021.
38 f.

Orientador: Leonardo Rocha Vidal Ramos .
Coorientador: Marcelo Maia Pereira.
Dissertação(Mestrado) . -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em
ciência animal, 2021.

1. Bem-estar. 2. Laranja. 3. Peixes ornamentais.
4. Transporte. I. Ramos , Leonardo Rocha Vidal , 1985
, orient. II. Pereira, Marcelo Maia , 1982-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de pós-graduação em ciência animal.
IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO Nº 278 / 2022 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.017166/2022-10

Seropédica-RJ, 17 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAFAEL CARVALHO DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/10/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Banca Examinadora:

Leonardo Rocha Vidal Ramos, Dr.. UFRRJ - (Presidente)

Jane Mello Lopes , Dr.⁸ UFMA

Matheus Pereira dos Santos, Dr. UFRRJ

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 07:24)
LEONARDO ROCHA VIDAL RAMOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.63)
Matrícula: 2376201

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 16:26)
MATHEUS PEREIRA DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.63)
Matrícula: 3067308

(Assinado digitalmente em 17/03/2022 16:39)
JANE MELLO LOPEZ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 520.526.990-15

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **278**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **17/03/2022** e o código de verificação: **982dd87f9e**

DEDICATÓRIA

A Deus meu refúgio e fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Sou grato aos meus pais Raimundo Fortes da Silva e Aldemires da Penha Carvalho por me apoiarem nas minhas decisões, mesmo nos momentos em que eu cheguei a duvidar de mim.

Às minhas irmãs Raqueline Carvalho da Silva e Rainny Carvalho da Silva pelo apoio e carinho.

Ao meu avô José Ferreira de Carvalho pelo carinho, paciência e cuidados durante todos esses anos.

Ao Igor de Fiúza França por ceder os animais utilizados neste estudo e auxiliar na realização dos experimentos.

A Bruna Tassia dos Santos Pantoja por aceitar participar deste trabalho como colaboradora.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Leonardo Rocha Vidal Ramos pelo carinho, parceria e ensinamentos.

Ao meu coorientador professor Dr. Marcelo Maia Pereira pelo apoio com as análises estatísticas.

Aos professores Dr. Matheus Pereira dos Santos e Dr^a Jane Mello Lopes por aceitarem compor a banca de defesa.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Instituto de Zootecnia pela oportunidade de cursar o mestrado.

A todo o corpo docente da Pós-graduação em Ciência Animal-UFRRJ pelos conhecimentos adquiridos.

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

Silva, Rafael Carvalho da. **Efeito Anestésico e Toxicidade Aguda do Óleo Essencial de *Citrus sinensis* em *Betta splendens***. 2021. 38p. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

RESUMO

O óleo essencial de *Citrus sinensis* (OECS) apresenta propriedades sedativas e anestésicas, constituindo assim, uma alternativa aos anestésicos sintéticos comumente usados em aquicultura. O peixe beta *Betta splendens* é conhecida pela sua beleza, de grande variedade de conformações corporais e cores, e também pela agressividade demarcada em machos adultos da espécie. Este trabalho teve o objetivo de estudar a toxicidade aguda do óleo essencial de *Citrus sinensis* em *Betta splendens*, os tempos de indução e de recuperação da anestesia, sua ação sobre o comportamento agonista de machos adultos e seus efeitos no transporte coletivo de machos desta espécie. No teste de toxicidade aguda para 48h de exposição, foram testadas as concentrações 0 + 540 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etanol (controle), 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS, com seis repetições cada, tais concentrações foram definidas a partir de ensaios previamente realizados. Em seguida, foi realizado um ensaio para avaliar os tempos de indução e recuperação da anestesia (N=6), onde foram avaliadas as concentrações 0 + 2700 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etanol (controle), 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ do OECS, com seis repetições para cada tratamento. A avaliação do comportamento agonista entre machos de *B. splendens* expostos ao OECS foi realizada através da exposição dos animais ao OECS durante encontros agonísticos, sendo avaliadas as concentrações 0 + 270 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etanol, 10, 20 e 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS, com seis repetições para cada tratamento. Para o ensaio de transporte coletivo de indivíduos machos durante 6h, foram usadas as concentrações de 0,0 ou 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS, com quatro repetições cada, e tais dosagens foram definidas com base nos ensaios anteriores. Nesse estudo, foi ainda feita a coleta de brânquias para avaliar possíveis danos histológicos durante a exposição ao OECS no transporte. Em relação ao teste de toxicidade aguda do OECS os resultados mostram que a CL₅₀ 48h de OECS foi calculada em 49,17 $\mu\text{l L}^{-1}$. No experimento de indução com o OECS, os peixes atingiram diferentes estágios anestésicos, e não foram observadas mortalidades durante a indução ou recuperação dos peixes. Foram requeridas concentrações de OECS a partir de 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ para induzir o *B. splendens* à anestesia em 3,3 minutos. A adição do OECS na água de transporte de *B. splendens* machos permitiu que, ao final do transporte, os animais mantivessem seu estado corporal, sem nenhum dano aparente externo causado pelo comportamento agonista, diferentemente dos animais transportados sem a adição do OECS, que exibiram alterações de cor e com nadadeiras danificadas, causadas por disputas entre os animais. Os resultados evidenciaram que o OECS na faixa de 10 a 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ pode atuar como agente redutor da agressão nesta espécie. Nenhuma alteração histológica foi observada nas brânquias dos peixes expostos a 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ do OECS durante o transporte. Assim, conclui-se que a CL₅₀ em 48h do óleo essencial de *Citrus sinensis* é de 49,17 $\mu\text{l L}^{-1}$. O óleo essencial de *Citrus sinensis* mostrou-se um anestésico eficaz e seguro para o *B. splendens*. Além disso, a concentração de 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ do OECS é recomendada para o transporte coletivo de machos desta espécie, uma vez que nenhuma alteração na aparência externa dos animais e nem ao nível histológico foi observada nos peixes expostos a esta concentração.

Palavras-chave: Bem-estar, Laranja, Peixes ornamentais, Transporte.

Silva, Rafael Carvalho da. **Anesthetic Effect and Acute Toxicity of *Citrus sinensis* Essential Oil on *Betta splendens***. 2021. 38p. Master's dissertation. Post-Graduation in Animal Science, Post-Graduate Program in Animal Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

ABSTRACT

Citrus sinensis essential oil (EOCS) has sedative and anesthetic properties, thus constituting an alternative to synthetic anesthetics commonly used in aquaculture. The beta fish *Betta splendens* is known for its beauty, wide variety of body shapes and colors, and also for its marked aggressiveness in adult males of the species. This work aimed to study the acute toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Betta splendens*, the induction and recovery times from anesthesia, its action on the agonist behavior of adult males and its effects on the collective transport of males of this species. In the acute toxicity test for 48h exposure, the concentrations 0 + 540 $\mu\text{L L}^{-1}$ of ethanol (control), 20, 30, 40, 50 and 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ of EOCS were tested, with six repetitions each, such concentrations were defined from tests previously carried out. Then, an assay was performed to evaluate anesthesia induction and recovery times (N=6), where the concentrations 0 + 2700 $\mu\text{L L}^{-1}$ of ethanol (control), 25, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 $\mu\text{L L}^{-1}$ of the EOCS were evaluated, with six repetitions for each treatment. The evaluation of agonist behavior among males of *B. splendens* exposed to the EOCS was performed by exposing the animals to the EOCS during agonistic encounters, with concentrations of 0 + 270 $\mu\text{L L}^{-1}$ of ethanol, 10, 20 and 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ being evaluated of EOCS, with six repetitions for each treatment. For the collective transport test of male individuals for 6h, concentrations of 0.0 or 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ of EOCS were used, with four repetitions each, and such dosages were defined based on the previous tests. In this study, the collection of gills was also performed to assess possible histological damage during exposure to EOCS during transport. Regarding the EOCS acute toxicity test, the results show that the EOCS 48h LC₅₀ was calculated as 49.17 $\mu\text{l L}^{-1}$. In the EOCS induction experiment, fish reached different anesthetic stages, and no mortalities were observed during fish induction or recovery. EOCS concentrations from 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ were required to induce *B. splendens* to anesthesia in about 3.3 minutes. The addition of EOCS to the transport water of male *B. splendens* allowed the animals to maintain their body status at the end of transport, without any apparent external damage caused by agonist behavior, unlike animals transported without the addition of EOCS, which exhibited color changes and with damaged fins, caused by disputes between animals. The results showed that EOCS in the range of 10 to 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ can act as an aggression-reducing agent in this species. No histological changes were observed in the gills of fish exposed to 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ of the EOCS during transport. Thus, it is concluded that the LC₅₀ in 48h of *Citrus sinensis* essential oil is 49.17 $\mu\text{l L}^{-1}$. The essential oil of *Citrus sinensis* proved to be an effective and safe anesthetic for *B. splendens*. In addition, the concentration of 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ of the EOCS is recommended for the collective transport of males of this species, since no changes in the external appearance of the animals or in the histological level were observed in fish exposed to this concentration.

Key words: Orange, Ornamental fish, Transport, Welfare.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais clínicos observados em <i>B. splendens</i> expostos a diferentes concentrações de OECS	12
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estação de Biologia Marinha (EBM): (A) Vista de frente; (B) Vista interna do laboratório de bioensaio.....	8
Figura 2. Biometria: (A) Pesagem, e (B) Medição dos animais.....	9
Figura 3. <i>B. splendens</i> macho (A) e fêmea (B) do grupo controle. <i>B. splendens</i> macho (C) e fêmea (D), expostos a 30 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS durante o ensaio de toxicidade aguda	13
Figura 4. Nadadeira caudal de <i>B. splendens</i> macho do grupo controle (A), e em (B) macho exposto a 60 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS durante o ensaio de toxicidade aguda	13
Figura 5. <i>B. splendens</i> fêmeas, após exposição a 60 $\mu\text{l L}^{-1}$ do OECS durante o ensaio de toxicidade aguda. Observa-se a presença de abaulamento do abdômen (A, B, C) das fêmeas expostas ao OECS, além de alteração da coloração (A e C) em comparação com animal do grupo controle (D)	14
Figura 6. Sedação estágios I e II (A e B, respectivamente), indução a anestesia profunda (C) e tempos de recuperação (D) de <i>B. splendens</i> em diferentes concentrações de OECS.....	15
Figura 7. Comportamento agonista (A) e frequência respiratória (B) de machos adultos de <i>B. splendens</i> durante 30 minutos de exposição a diferentes concentrações de OECS.....	15
Figura 8. <i>B. splendens</i> macho do grupo controle (A), e (B) animal transportado em água contendo 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS.....	16
Figura 9. Corte longitudinal de filamentos branquiais de <i>B. splendens</i> expostos ao OECS. Imagens A e B correspondem ao tratamento controle (0,0 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS), C e D correspondem ao grupo tratado (20 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS)	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A Aquicultura no Cenário Atual.....	3
2.2 Betta (<i>B. splendens</i>).....	3
2.3 Anestésicos e Analgésicos Usados na Aquicultura.....	4
2.4 Óleos Essenciais Como Anestésicos Para Peixes.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Local do Experimento.....	8
3.2 Animais.....	8
3.3 Óleo Essencial de <i>Citrus sinensis</i>.....	9
3.4 Toxicidade Aguda do OECS em <i>B. splendens</i>.....	9
3.5 Pré-teste de Indução a Anestesia.....	9
3.6 Indução a Anestesia e Recuperação	10
3.7 Avaliação do Comportamento Agressivo do <i>B. splendens</i> Exposto ao OECS	10
3.8 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de <i>B. splendens</i>.....	11
3.9 Análises Estatísticas.....	11
4 RESULTADOS	12
4.1 Toxicidade Aguda do OECS em <i>B. splendens</i>.....	12
4.2 Indução a Anestesia e Recuperação	14
4.3 Avaliação do Comportamento Agressivo do <i>B. splendens</i> Exposto ao OECS	15
4.4 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de <i>B. splendens</i>.....	15
5 DISCUSSÃO	18
5.1 Toxicidade Aguda do OECS em <i>B. splendens</i>.....	18
5.2 Indução a Anestesia e Recuperação	18
5.3 Avaliação do Comportamento Agressivo do <i>B. splendens</i> Exposto ao OECS	19
5.4 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de <i>B. splendens</i>.....	20
6 CONCLUSÃO.....	22
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade consolidada e em franca expansão no mundo, muito embora nos últimos anos (2001-2018) tenha apresentado uma taxa de crescimento ao ano de 5,3 %, ainda assim a aquicultura se mantém como o setor agroindustrial que mais cresce em relação aos demais. Vale apena ressaltar que em 2018 a produção aquícola atingiu um novo recorde histórico com a marca de 179 milhões de toneladas, com maior destaque para a produção de peixes (FAO, 2020).

Dentre os segmentos da piscicultura, a produção e comercialização de peixes ornamentais figura como uma atividade promissora (DUARTE et al., 2015). No Brasil essa atividade teve inicio há pouco tempo e surgiu com a implantação de projetos de piscicultura na década de 70 (ZUANON et al., 2009). Atualmente, seu foco são as exportações para países como Japão, Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido (RIBEIRO et al., 2008). Hoje o Brasil é reconhecido como um importante exportador de peixes ornamentais, com um volume de exportações que aumentou de U\$ 5 milhões para U\$ 6 milhões no período de 2006 a 2007 (PAULA et al., 2018). No país são comercializadas diversas espécies de peixes ornamentais de água doce, mas o *B. splendens* é uma das espécies mais comercializadas (ZUANON et al., 2009; DUARTE et al., 2015; PAULA et al., 2018).

A indústria de peixes ornamentais ainda possui muitos desafios, como aumentar as exportações, facilitar a concessão de crédito aos aquicultores e principalmente reduzir os prejuízos econômicos devido à mortalidade decorrente das deficiências no manejo, captura e transporte (RIBEIRO et al., 2008; PEDRAZZANI e OSTRENSKY NETO, 2014; FERNANDES et al., 2017).

Rotineiramente na aquicultura moderna são realizadas algumas práticas como a biometria, análises patológicas, implantes hormonais e transporte (BECKER et al., 2018; LOPES et al., 2018), o que promove mudanças no ambiente e altera a homeostasia dos peixes e consequentemente afeta sua saúde e desempenho (DUARTE et al., 2015). O conhecimento de métodos que possibilitem intervenções menos invasivas é importante a fim de que a mortalidade seja mínima durante o manejo ou transporte (ZUANON et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2017).

Nesse contexto, os anestésicos são substâncias importantes utilizadas para facilitar o manejo e diminuir o estresse em animais aquáticos (SMALL, 2003), sendo conhecidos como agentes fármacos que são capazes de induzir os animais a diferentes estágios anestésicos que vão desde a sedação leve até a anestesia cirúrgica (CAN et al., 2018). Em baixas concentrações os anestésicos são usados com a finalidade de sedação para reduzir a atividade e a taxa metabólica, em contrapartida as concentrações mais elevadas são utilizadas durante procedimentos que são considerados estressantes ou dolorosos para os peixes (LOPES et al., 2018). Por esse motivo, a sedação é uma prática comum durante os procedimentos de transporte, enquanto que a anestesia geral é mais empregada em procedimentos cirúrgicos (SMALL, 2003; TEIXEIRA et al., 2017).

Já foram reportados diversos tipos de anestésicos, naturais e sintéticos, como o sulfato de quinaldina, a tricaina metano sulfonato (MS 222), a benzocaína e o fenoxyetanol, produtos químicos, que podem causar perda de muco e irritação das brânquias (CAN et al., 2018). Entre os naturais, menos residuais ou menos agressivos, estão o eugenol (PATTANASIRI et al., 2017a), óleo essencial (OE) de *Aloysia triphylla* (TEIXEIRA et al., 2017), *Lippia alba* e *Lippia origanoides* (BECKER et al., 2018), *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora* (BALDISSEROTTO et al., 2018) e os óleos essenciais de *Citrus aurantium* e *Citrus latifolia* (LOPES, et al., 2018).

A utilização de produtos derivados de fontes naturais, que apresentam atributos

anestésicos para peixes, pode constituir uma alternativa aos fármacos comumente empregados em aquicultura. Nesse sentido, estudar a toxicidade aguda do óleo essencial de *Citrus sinensis* em *Betta splendens*, tempos de indução e recuperação da anestesia, bem como avaliar possíveis alterações histológicas nos tecidos branquiais dos animais se faz essencial, a fim de definir a viabilidade desse óleo como anestésico eficaz, e, sobretudo seguro para o *B. plendens*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Aquicultura no Cenário Atual

Em 2018, a produção aquícola a nível mundial alcançou novos patamares foram produzidas cerca de 179 milhões de toneladas de peixes, deste total aproximadamente 4 milhões de toneladas foram de peixes ornamentais (FAO, 2020). O cultivo de organismos aquáticos ornamentais é uma atividade econômica bem estabelecida e amplamente distribuída em todo o mundo (MARQUES, 2020).

O interesse do Brasil na aquicultura ornamental é recente e ainda assim, o país já ocupa o 13º lugar no ranking internacional das exportações de peixes ornamentais, com um faturamento anual de U\$ 6.570 milhões. Entretanto, o país ainda ocupa um lugar modesto no mercado mundial frente aos maiores produtores. O maior exportador de peixes é a Singapura, que movimenta cerca de U\$ 44,205 milhões ao ano com exportações (EMBRAPA, 2018).

Quanto à comercialização interna, os maiores mercados consumidores de peixes ornamentais se concentram próximo aos grandes centros urbanos das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, apesar do mercado também ser bastante expressivo em capitais como Belo Horizonte e Curitiba (RIBEIRO et al., 2008).

O comércio varejista nacional exibe uma ampla variedade de espécies continentais e marinhas, entretanto o comércio de espécies de água doce é mais representativo em virtude da facilidade de manutenção e dos baixos custos em relação aos marinhas (PAULA et al., 2018). As principais espécies comercializadas são o beta *Betta splendens*, o kinguio *Carassius auratus*, a carpa *Cyprinus carpio* e o guppy *Poecilia reticulata* (RIBEIRO et al., 2008).

2.2 Betta (*B. splendens*)

Dentre as espécies mais cultivadas, o *B. splendens* apresenta diversas características favoráveis, como uma grande variedade de cores e conformações de nadadeiras, a respiração aérea acessória que possibilita sua manutenção em pequenos aquários sem aeração e a elevada procura no mercado. Em face dessas características, a criação desta espécie tem aumentado em todo o país (ZUANON et al., 2009).

B. splendens ou peixe betta como também é conhecido, integra um grupo de peixes chamados anabantídeos (subordem Anabantoidei) e pertence à família Osphronemidae (WATSON et al., 2019). Originário do sudeste asiático (Tailândia, Malásia), o *B. splendens* exibe cores variadas e nadadeiras exuberantes, sendo considerado um dos mais populares peixes ornamentais de água doce (FABREGAT et al., 2015). Embora, esta espécie não seja nativa do Brasil, sua produção e comercialização têm alcançado novos patamares no cenário do agronegócio brasileiro. Atualmente no país, a utilização desta espécie transcende o aquarismo convencional, uma vez que tem sido usada no controle biológico de larvas de mosquitos, por exemplo contra o *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (DUARTE et al., 2015).

O *B. splendens* é conhecido não somente por causa de sua beleza mais também devido a sua agressividade, em especial entre os machos da espécie (CASTRO et al., 2006). Nesta espécie o comportamento agonista tem várias funções, como reprodução e defesa de território (CRAFT et al., 2003; ALTON et al., 2013). Em ambientes de criação esse comportamento acaba dificultando o manejo dos peixes, principalmente em relação ao transporte, pois os machos necessitam ser embalados individualmente (FAO, 2010; PATTANASIRI et al., 2017b). Em razão dessas implicações, vários compostos como hormônios drogas antidepressivas e ansiolíticas vêm sendo testados com o intuito de diminuir a agressividade desses animais (COLYER e JENKINS, 1976; CLOTFELTER et al., 2007; KOHLERT et al.,

2012; SANTOS et al., 2016).

O comportamento de exibição, que é vinculado à demonstração de agressividade, pode ser caracterizado pela abertura opercular e expansão das nadadeiras. Tais exibições são intensas, causando mudanças significativas nos metabólitos musculares do indivíduo, o que resulta em aumento das taxas de captação de oxigênio (ALTON et al., 2013). Com o aumento da demanda de oxigênio acreditava-se que a respiração aérea acessória desses peixes poderia suprir pelo menos em parte o oxigênio necessário (ZUANON et al., 2009). Contudo, mais recentemente, Alton et al., (2013), elucidaram esses mecanismos e mostraram que durante o comportamento de exibição, o *B. splendens* consome mais oxigênio, e que esse aumento é compensado não pelo uso do oxigênio da água, mas do ar atmosférico através do aumento da taxa de respiração aérea. De certa forma sua respiração aérea possibilita ao *B. splendens* usar menos as brânquias para realizar as trocas gasosas na água, o que pode contribuir para deixá-lo mais resistente aos anestésicos quando diluídos em água (FABREGAT et al., 2015; PATTANASIRI et al., 2017a).

Durante o cultivo, os peixes ornamentais constantemente são expostos a situações estressantes como a classificação ou gradeamento, biometrias, análises patológica, comercialização e transporte (PATTANASIRI et al., 2017a). O transporte de peixes vivos, realizado rotineiramente na aquicultura, constitui um dos principais fatores que causam estresse nos peixes (TEIXEIRA et al., 2017; WANG et al., 2021). Quando o estresse é induzido por esse fator, os peixes respondem consumindo mais energia, o que afeta substancialmente a manutenção da homeostase (ROSS e ROSS, 2008; DUARTE et al., 2015; LOPES et al., 2018). O estímulo estressor ainda pode ser potencializado porque durante o transporte, a qualidade da água tende a diminuir, por exemplo, pela diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido, redução do pH e aumento dos níveis de amônia, e portanto, compromete o bem-estar e sobrevivência dos peixes.

A utilização de substâncias sedativas durante o transporte pode diminuir o metabolismo e a movimentação dos peixes, e consequentemente prevenir lesões físicas (TEIXEIRA et al., 2017). Dentre os anestésicos com potencial para utilização na manipulação de peixes destaca-se o eugenol (DUARTE et al., 2015), e o OE de cravo (PEDRAZZANI e OSTRENSKY NETO, 2014), essas substâncias mostraram-se eficazes como anestésicos para várias espécies de peixes como o *B. splendens* (DUARTE et al., 2015) *Rhamdia quelen* (SALBEGO et al., 2017) e o *Ictalurus punctatus* (WANG et al., 2021).

No entanto, Pattanasiri et al. (2017a), relataram que na literatura ainda há poucas informações sobre a toxicidade desses fármacos para os peixes, por isso, esses autores estudaram os efeitos do contato prolongado dessas substâncias com o *B. splendens*, e chegaram ao consenso de que dependendo da dose utilizada e o tempo de exposição dos peixes a esses produtos, tanto o OE de cravo como o eugenol pode apresentar toxicidade aos peixes. Os efeitos adversos desses agentes anestésicos incluem danos histopatológicos às brânquias, irritação dos olhos e em casos mais severos a morte dos peixes. As alterações branquiais mais comuns observadas em *B. splendens* exposto ao óleo de cravo são a hiperplasia epitelial, fusão das lamelas secundárias e necrose, elevação epitelial, dilatação dos vasos sanguíneos e congestão sanguínea, com danos graves (WARISTHA et al., 2011).

2.3 Anestésicos e Analgésicos Usados na Aquicultura

O mercado internacional de peixes ornamentais tem recebido grande atenção nos últimos anos, devido a sua importância econômica. Nesse cenário, a participação do Brasil neste segmento cria novas perspectivas, principalmente em relação à geração de renda (ZUANON et al., 2009; PAULA et al., 2018). Paralelamente à expansão desta atividade, a melhoria da saúde dos peixes destinados à comercialização tem recebido atenção. O bem-estar

dos peixes é importante não apenas para os consumidores mais exigentes, mas também para os produtores em termos de uma maior sobrevivência, quantidade e qualidade (DUARTE et al., 2015).

Ações rotineiras realizadas na aquicultura como biometria, análises patológicas, manejo, aplicação hormonal, captura e transporte podem causar grandes prejuízos econômicos em virtude da interferência dessas ações no crescimento e sobrevivência dos peixes (PATTANASIRI et al., 2017a; LOPES et al., 2018). Na verdade, as práticas da aquicultura moderna frequentemente expõem os animais a situações estressantes que podem afetar negativamente seu sistema imunológico, crescimento e sobrevivência (SANTOS et al., 2020; VANDERZWALMEN et al., 2020). Nesse sentido, substâncias anestésicas têm sido utilizadas com o intuito de minimizar os efeitos do estresse em várias espécies de peixes (PEDRAZZANI e OSTRENSKY NETO, 2014; TEIXEIRA et al., 2017; BECKER et al., 2018).

O processo de anestesia envolve várias fases, incluindo a sedação, imobilização, inconsciência, amnésia e analgesia. A sedação é caracterizada pela redução da sensibilidade, enquanto que a anestesia geral causa um estado de inconsciência, amnésia, imobilização e, além disso, causa o alívio da dor (ZAHN et al., 2012). Portanto, um mesmo fármaco pode ser considerado sedativo (calmante) e anestésico dependendo da concentração empregada, tempo de exposição e consequentemente, o efeito provocado no organismo vivo (LOPES et al., 2018).

De acordo com Small (2003), o processo de anestesia em peixes envolve quatro estágios, a saber: estágio I – sedação, diminuição de reatividade a estímulos externos; estágio II – perda parcial de equilíbrio, nadar errático; estágio III – perda total de equilíbrio, cessão da locomoção; estágio IV – colapso medular.

Atualmente, existem vários métodos de administração de anestésicos em peixes, no entanto, a imersão do animal em solução anestésica ainda é o método mais comum. O agente anestésico presente na água é absorvido através das brânquias, difunde-se para o sangue e alcança o sistema nervoso central (SNC), uma vez no sistema nervoso central essa substância reconhece e liga-se seletivamente a determinados receptores e como consequência desencadeia uma série de eventos que culminam na sedação ou anestesia do peixe (BECKER et al., 2018; LOPES et al., 2018). Segundo Ross e Ross, (2008), a depressão generalizada do SNC provocada pelos anestésicos gerais ocorre devido a sua ação sobre o axônio do nervo, a liberação de transmissores ou a excitabilidade da membrana, ou ainda a combinação dessas ações, basicamente os mecanismos de ação dos agentes anestésicos incluem a estabilização da propagação de impulsos nervosos em axônios aferentes e/ou eferentes, bloqueio da liberação de neurotransmissores na membrana pré-sináptica e bloqueio competitivo de sítios de ligação na membrana pós-sináptica. O efeito anestésico geralmente é avaliado através dos tempos de indução e recuperação da anestesia, reações reflexas em função de estímulos externos e capacidade de resposta a manipulação (SMALL, 2003; ZAHN et al., 2012).

No Brasil, ainda não há uma legislação que trata especificamente da utilização dos anestésicos na aquicultura (LIMMA-NETTO et al., 2016). Atualmente, há em vigência apenas as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que se referem exclusivamente aos procedimentos de eutanásia e indicam para esse fim o uso dos fármacos metano de tricaina ou MS222 e hidrocloridrato de benzocaína (CONCEA, 2013). Em outros países, uma variedade de substâncias anestésicas sintéticas tem sido usada em peixes. Dentre as mais comuns estão tricaina metano sulfato (MS 222), 2-fenoxietanol, quinaldina e benzocaína (CAN et al., 2018).

No entanto, alguns fatores acabam limitando a utilização desses anestésicos como o preço, aquisição (FAO, 2010; PEDRAZZANI e OSTRENSKY NETO, 2014), a incidência de reações adversas como irritação das brânquias dos peixes, e, além disso, podem deixar resíduos

nos animais e na água (LIMMA-NETTO et al., 2016; CAN et al., 2018). Desta forma, a escolha de um anestésico deve estar atrelada, entre outros fatores, com sua viabilidade econômica, praticidade no uso, eficiência e capacidade de minimizar o estresse (LOPES et al., 2018). Bem como a sua segurança tanto para o peixe, quanto para o manipulador e o meio ambiente (CAN et al., 2018). Logo, devido a essas implicações pesquisas com anestésicos de fontes naturais vêm sendo realizadas (PATTANASIRI et al., 2017a; TEIXEIRA et al., 2017; BECKER et al., 2018).

2.4 Óleos Essenciais Como Anestésicos Para Peixes

Diversos estudos relataram recentemente o uso de produtos de fontes naturais utilizados como anestésicos em peixes. Os OEs extraídos do cravo (WARISTHA et al., 2011; PATTANASIRI et al., 2017a; PATTANASIRI et al., 2017b) *Lippia alba*, *Lippia origanoides* (BECKER et al., 2018), *Citrus aurantium*, *Citrus latifolia* (LOPES et al., 2018), bem como compostos isolados a partir de plantas como o linalol (BALDISSEROTTO et al., 2018), timol (WANG et al., 2021) e o eugenol (DUARTE et al., 2015; PATTANASIRI et al., 2017a); mostram-se eficazes para diferentes espécies de peixes.

A família botânica Rutaceae compreende 150 gêneros e 1.500 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e de clima temperado. No Brasil, a família é representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, sendo algumas de grande interesse medicinal, ecológico e econômico (MELO, 2004). As plantas pertencentes a essa família são algumas das culturas mais cultivadas e comercializadas no mundo, integra as laranjas, bergamotas e limões (DOSOKY e SETZER, 2018). Essas frutas ocupam um lugar de destaque na horticultura e economia brasileira, e anualmente só a produção de laranja corresponde a 18 milhões de toneladas e a produção de limão a pelo menos 1 milhão de toneladas (SILVA et al., 2017). A maior parte da produção é destinada a fabricação de suco, o que gera uma significativa quantidade de resíduos (cascas, sementes e poupas), que correspondem a 50 % do fruto (DOSOKY e SETZER, 2018), sendo esse resíduo uma valiosa fonte de OEs, vitaminas (MANNUCCI et al., 2018), monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoídes, metabolitos que conferem suas características organolépticas (LOPES et al., 2018).

A laranja doce *Citrus sinensis* é uma espécie frutífera originária do sul da China. Seus frutos são muito apreciados em todo o mundo, não somente por causa de sua utilização na indústria de suco, mas também porque podem ser consumidos diretamente e seus derivados usados na fabricação de refrigerantes, sobremesas, doces, geleias, biscoitos e bolos (MANNUCCI et al., 2018). Além disso, produzem uma considerável quantidade de OE a partir de suas cascas (DOSOKY e SETZER, 2018), que são utilizados para fabricação de perfumes e alguns tipos de plásticos (MANNUCCI et al., 2018).

Recentemente, estudos têm atribuído ao óleo essencial de *Citrus sinensis* (OECS) diversas atividades biológicas: anticancerígena, relaxante muscular, ansiolítica, antibacteriana e anti-helmíntica (DOSOKY e SETZER, 2018; MANNUCCI et al., 2018). Segundo Becker et al. (2018) e Mirghaed et al. (2016), as atividades biológicas dos OEs são causadas pelos seus constituintes majoritários, particularmente OECS é rico em moléculas bioativas como o d-limoneno e o Y-terpineno (MANNUCCI et al., 2018). Lopes et al. (2018), afirmam que essas mesmas substâncias são os componentes principais dos OEs de *Citrus aurantium* e *Citrus latifolia*, e que ambos os óleos apresentaram potencial para serem usados na sedação eanestesia do jundiá (*Rhamdia quelen*). Provavelmente esse efeito esta relacionado ao envolvimento com as vias GABAérgicas, no entanto, a existência de outros possíveis mecanismos neuroquímicos não podem ser descartados (MANNUCCI et al., 2018).

Diante da ausência de informações e contribuição, a avaliação do OECS como agente

anestésico para o *B. plendens* pode contribuir para o esclarecimento de mecanismos ainda não muito bem elucidados, e desta forma, fornecendo dados relevantes para utilização desse produto na aquicultura como ferramenta biotecnológica necessária para a produção animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido na Estação de Biologia Marinha (EBM) (Figura 1) do Instituto de Zootecnia (IZ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no distrito de Itacuruçá, no município de Mangaratiba – RJ, Brasil (latitude 22°54'06" e longitude 43° 33' 42"), autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRRJ/IZ), sob o processo n° 0108-08-2020.



Figura 1. Estação de Biologia Marinha (EBM): (A) Vista de frente; (B) Vista interna do laboratório de bioensaio.

3.2 Animais

Foram utilizados 196 animais entre machos e fêmeas aos seis meses de idade, com peso médio de $1,1 \pm 0,08$ g e $3,02 \pm 0,21$ cm de comprimento total. Os peixes usados no presente estudo foram provenientes de reproduções obtidas de animais da própria EBM.

Os peixes foram sexados e estocados, os machos individualmente em aquários de 2 L^{-1} e as fêmeas coletivamente em uma caixa de 100 L^{-1} , onde permaneceram durante 15 dias para aclimatação prévia aos experimentos. Durante este período receberam ração comercial para peixes ornamentais (40 % de proteína bruta) fornecida até a saciedade aparente duas vezes ao dia. Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados as (09h00 e 17h00) utilizando-se um medidor multiparâmetro Akso®, modelo AK88 para verificar a temperatura, pH e oxigênio dissolvido, e um kit comercial colorimétrico para medir a amônia não ionizada (NH_3). Todos os parâmetros de qualidade de água permaneceram dentro da faixa considerada ideal para o *B. splendens*, temperatura $28 \pm 0,11$ °C, pH $7,4 \pm 0,20$, oxigênio dissolvido $7,0 \pm 0,06$ mg/L $^{-1}$ e amônia não ionizada $0,001 \pm 0,02$ mg/L $^{-1}$. Previamente ao início dos experimentos, os animais foram submetidos a um jejum de 24 horas.

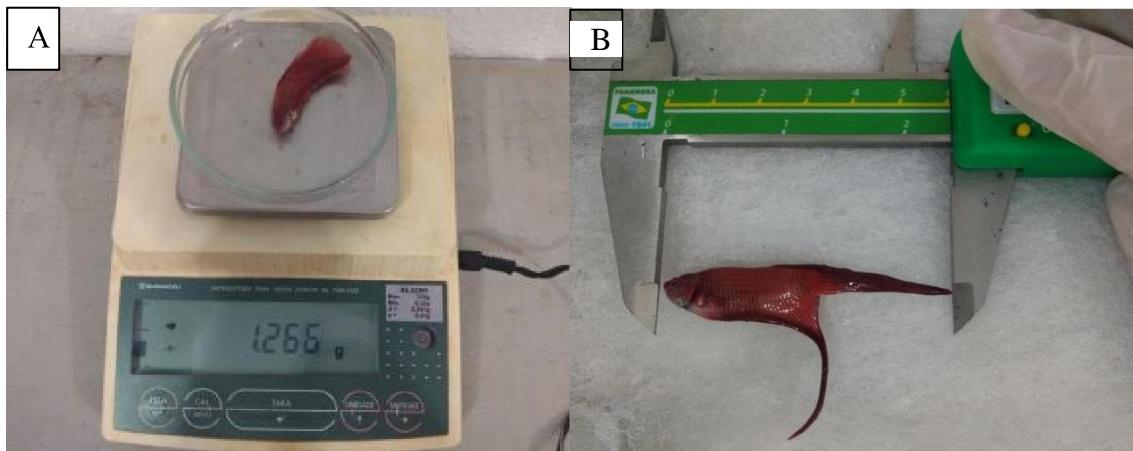


Figura 2. Biometria: (A) Pesagem e (B) Medição dos animais, após a realização dos experimentos.

3.3 Óleo Essencial de *Citrus sinensis*

O óleo essencial utilizado no presente estudo foi comercializado pela FERQUIMA®, São Paulo, Brasil. A identificação dos compostos químicos presentes no OECS foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), conforme descrito previamente por Lopes et al. (2018). Os principais constituintes do OECS foram limoneno (93,20 %), mirceno (1,60 %), sabineno (0,25 %), α -pineno (0,40 %) e 4,55 % eram compostos minoritários não identificados.

3.4 Toxicidade Aguda do OECS em *B. splendens*

Inicialmente, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas antes de iniciar os experimentos. A concentração letal de OECS para o *B. splendens* foi determinada usando o teste de toxicidade aguda durante um período de exposição de 48h. As concentrações utilizadas foram predeterminadas por meio de teste preliminar de tolerância, nos quais os valores escolhidos para o teste de toxicidade aguda corresponderam a menor concentração testada ($60 \mu\text{L L}^{-1}$) capaz de causar 100 % de mortalidade, e a maior concentração ($20 \mu\text{L L}^{-1}$) que não causou mortalidade entre os peixes (PATTANASIRI et al., 2017a). Para determinar a concentração letal (CL_{50-48h}), foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições, onde foram testadas as concentrações $0 + 540 \mu\text{L L}^{-1}$ de etanol, $20, 30, 40, 50$ e $60 \mu\text{L L}^{-1}$ de OECS. Cada concentração foi testada em ambos os sexos, ou seja, três fêmeas e três machos de *B. splendens*. A exposição dos animais ao OE ocorreu em aquários de vidro (1 L^{-1}), com um peixe por aquário e o OECS previamente diluído em etanol na proporção (1:10). A tolerância dos peixes ao OECS foi monitorada por meio de análise descritiva quantitativa durante o período de 48h. Em relação à mortalidade, foram levados em consideração os seguintes critérios: ausência de movimentação opercular e reação a qualquer estímulo externo. Com a confirmação da morte, os peixes foram pesados, medidos e identificados.

3.5 Pré-teste de Indução a Anestesia

O pré-teste de indução a anestesia foi utilizado para indicar as possíveis concentrações de OECS capaz de induzir sedação e anestesia nos peixes por evitar o colapso medular ou

morte dos animais por excesso de OE, ou ausência de sinais característicos da sedação por falta de OE. Inicialmente o OECS foi diluído em etanol P.A. na proporção (1:10) em virtude de sua natureza lipídica, em diferentes concentrações variando de 25 a 350 $\mu\text{L L}^{-1}$ e cada concentração foi avaliada em triplicata. Esse intervalo entre as concentrações foi definido a partir do estudo realizado por Lopes et al., (2018) e Pattanasiri et al., (2017a). Em seguida, o OECS foi incorporado homogeneamente à água dos aquários-teste (1 L^{-1}). Após jejum de 24h, os peixes machos e fêmeas foram transferidos individualmente para os aquários-teste constantemente aerados (BECKER et al., 2018). O contato entre os peixes e o OE teve duração de 30 minutos e após esse período os peixes foram agrupados de acordo com a concentração testada, sendo que os machos foram transferidos individualmente para aquários de 2 L^{-1} e as fêmeas mantidas em aquários de 3 L^{-1} , onde permaneceram em observação durante 24h para observar a ocorrência de mortalidade.

3.6 Indução a Anestesia e Recuperação

Durante esta etapa, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos com concentrações crescente de OECS (0 + maior concentração de etanol utilizada para diluição do OECS, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{L L}^{-1}$) e seis repetições. Foram utilizados três fêmeas e três machos em cada concentração. Os animais foram transferidos para aquários contendo 1 L de água aerada continuamente com o OECS previamente diluído em etanol na proporção 1:10. Os peixes obedeceram a um jejum de 24h antes da realização do experimento e cada peixe foi utilizado uma única vez como descrito por Becker et al., (2018).

Os peixes foram observados durante a imersão anestésica que teve duração máxima de 30 minutos e a avaliação de cada estágio de anestesia foi uma adaptação de Small, (2003), como segue: Estágio I - sedação leve, com menor reatividade a estímulos externos; Estágio II - sedação profunda, com perda parcial de equilíbrio e natação irregular; e Estágio III - anestesia profunda, com perda total de equilíbrio, cessação da locomoção e ausência de resposta a estímulos táteis. O tempo necessário para os peixes atingirem cada estágio anestésico foi determinado em segundos, com o auxílio de um cronômetro digital. Um bastão de vidro foi utilizado para tocar os peixes e auxiliar na determinação dos estágios anestésicos.

Após o tempo de indução, os animais foram transferidos para aquários de 1 L^{-1} livres de OE e com aeração constante para mensurar o tempo de recuperação, e somente foram considerados recuperados quando apresentaram comportamento normal de natação e resposta a estímulos externos ao serem tocados com bastão de vidro. Após a recuperação, os peixes foram agrupados de acordo com a concentração testada e transferidos para aquários (2 L^{-1}) constantemente aerados, onde foram monitorados por 48 h para observar a ocorrência de mortalidade pós-indução. Os machos foram mantidos individualmente.

3.7 Avaliação do Comportamento Agressivo do *B. splendens* Exposto ao OECS

O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, sendo avaliadas as concentrações 0, 10, 20 e 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS. Para o controle foi usada a maior concentração de etanol utilizada para a diluição do OECS ($270 \mu\text{L L}^{-1}$), mas sem a adição do OECS. Para avaliar o comportamento agonista e frequência de respiração do ar atmosférico durante a interação macho-macho, os peixes foram transferidos individualmente para aquários (1 L^{-1}) e o OECS previamente diluído em etanol na proporção (1:10).

Em seguida o comportamento de exibição foi incentivado colocando-se um outro aquário contendo um animal macho isento do tratamento com o OECS ao lado do aquário com

o peixe tratado, permitindo assim, que os peixes se vissem e interagisse através do vidro adaptado de Alton et al., (2013). O tempo de exposição dos animais ao OE foi de 30 minutos durante o contato visual entre os peixes foi avaliado o comportamento agressivo caracterizado pela contabilização do número de vezes em que houve a abertura do opérculo e expansão das nadadeiras (caudal, dorsal e anal), bem como a contabilização da frequência respiratória aérea dos animais, ou seja, a quantidade de emersões para a obtenção de oxigênio.

3.8 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de *B. splendens*

Para o transporte, foram usadas duas concentrações de OECS (0; 20 $\mu\text{L L}^{-1}$) em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições. Para tal o OECS foi previamente diluído em etanol conforme descrito anteriormente antes de adicionado à água. Foram utilizados sacos de polietileno de 30 L^{-1} , onde foram acondicionados 5 L de água e o OE na concentração de interesse, preenchidos com ar e fechados com tiras elásticas. Em cada saco de polietileno, foi transportado um total de 10 machos adultos de *B. splendens*, sendo que o transporte foi realizado em um carro e este permaneceu circulando pela cidade de Seropédica até completar 6 h, conforme a metodologia descrita por Teixeira et al., (2017).

A simulação do transporte iniciou às 8h da manhã, saindo da Estação de Biologia Marinha do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Mangaratiba, RJ, em direção a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil (uma distância de 55 km), e posteriormente retornando ao ponto de partida, com intervalos de espera até o fim do tempo total, de 6 h. Ao final do transporte foram avaliados os parâmetros de qualidade de água através do uso do medidor multiparâmetro Akso®, modelo AK88 para verificar a temperatura, pH e oxigênio dissolvido. A amônia total e a amônia não ionizada (NH_3) foram obtidas através de kit comercial colorimétrico, sendo esses parâmetros medidos antes (tempo zero) e após o transporte.

Os peixes foram observados para avaliar a incidência de danos externos provocados pela disputa entre os animais. Em seguida, foram coletados 4 peixes aleatoriamente de cada tratamento para estudo histológico das brânquias e eutanaziados por secção da medula espinhal de acordo com Neves et al., (2017). As amostras de tecido branquial foram acondicionadas em formol tamponado a 10 % por 48 h. Após o período de fixação, os arcos branquiais foram desidratados em série crescente de álcool etílico (70 %, 80 %, 90 % e 99,99 % (absoluto), diafanizados em xitol e incluídos em parafina. Após isso, com o auxílio de micrótomo, os blocos resultantes do processamento histológico foram seccionados na espessura de 5 μm . As lâminas confeccionadas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e foto documentadas adaptado de Santos et al. (2020). Toda análise histológica foi realizada no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados dos experimentos de comportamento agonista e frequência respiratória, tempos de indução a sedação, anestesia e recuperação foram analisados utilizando o software SAS (SAS instituto, 2008). Os dados foram previamente convertidos por transformação logarítmica e então submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e Barlett para verificar a normalidade e a homocedasticidade dos dados, e então submetidos a regressão linear. Para a análise de toxicidade e determinação da CL₅₀ do OECS durante 48h de exposição foi utilizado o Teste TSK (Trimmed Spearman-Karber) sem a eliminação dos limites inferiores e superiores dos dados de mortalidade (HAMILTON et al., 1977).

4 RESULTADOS

4.1 Toxicidade Aguda do OECS em *B. splendens*

Os resultados obtidos demonstram que a menor concentração de OECS utilizada 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ causou 0 % de mortalidade, enquanto a maior concentração, 60 $\mu\text{l L}^{-1}$, levou a 100 % de mortalidade em um período de 48h de exposição. A CL₅₀ de OECS capaz de causar 50 % de mortalidade em 48h foi estimada em 49,17 $\mu\text{l L}^{-1}$. Análises visuais revelaram que os peixes expostos às maiores concentrações (30, 40, 50 e 60 $\mu\text{l L}^{-1}$) de OECS apresentaram sinais clínicos relacionados às características anatômicas externas, como opacidade da córnea, perda excessiva de muco do corpo e alteração de cor (Tabela 1) e (Figura 3). Além disso, os animais expostos às concentrações de 50 e 60 $\mu\text{l L}^{-1}$ de OECS apresentaram danos severos às nadadeiras (Figura 4) e a maior dose 60 $\mu\text{l L}^{-1}$ causou um abaulamento do abdômen dos peixes, principalmente nas fêmeas (Figura 5). As concentrações de 50 e 60 $\mu\text{l L}^{-1}$ ao final do teste causaram a mortalidade de 67 e 100 % dos animais respectivamente.

Tabela 1. Sinais clínicos observados (%) em *B. splendens* expostos a diferentes concentrações de OECS.

Sinais clínicos	Concentrações de OECS ($\mu\text{l L}^{-1}$)					
	0	20	30	40	50	60
Opacidade da córnea	0	0	33,33	66,67	100,00	100,00
Brânquia opaca	0	0	0	0	0	0
Hemorragia no pendulo caudal	0	0	0	0	0	0
Excesso de muco na pele e brânquias	0	0	0	0	0	0
Perda excessiva de muco do corpo	0	0	33,33	50,00	100,00	100,00
Alteração de cor	0	0	33,33	100,00	100,00	100,00

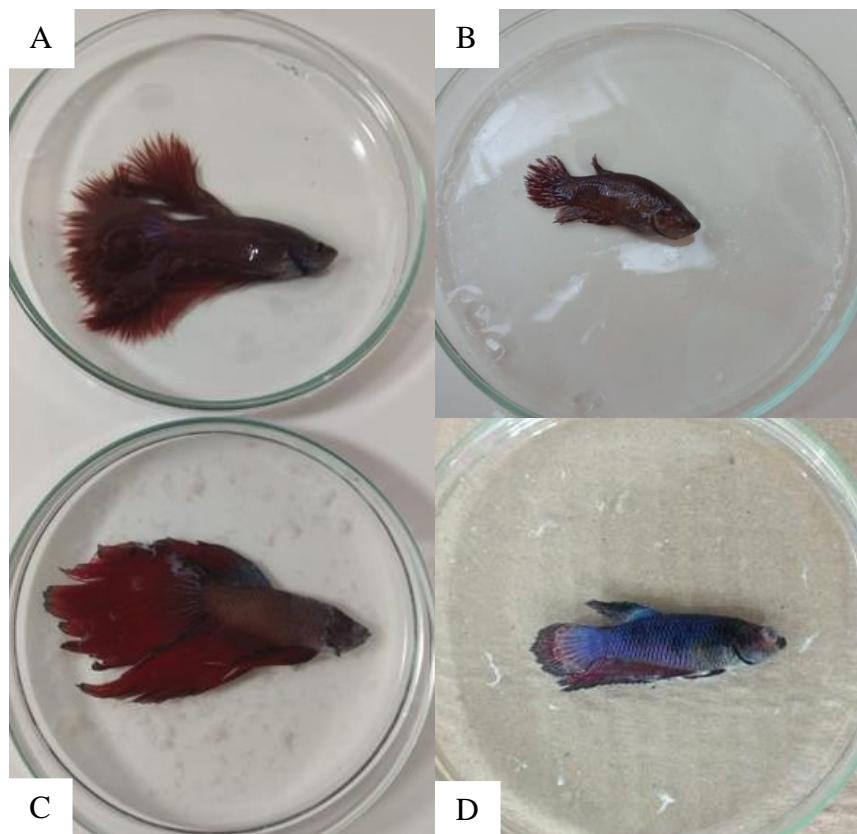


Figura 3. *B. splendens* macho (A) e fêmea (B) do grupo controle. *B. splendens* macho (C) e fêmea (D), expostos a $30 \mu\text{L}^{-1}$ de OECS durante o ensaio de toxicidade aguda.

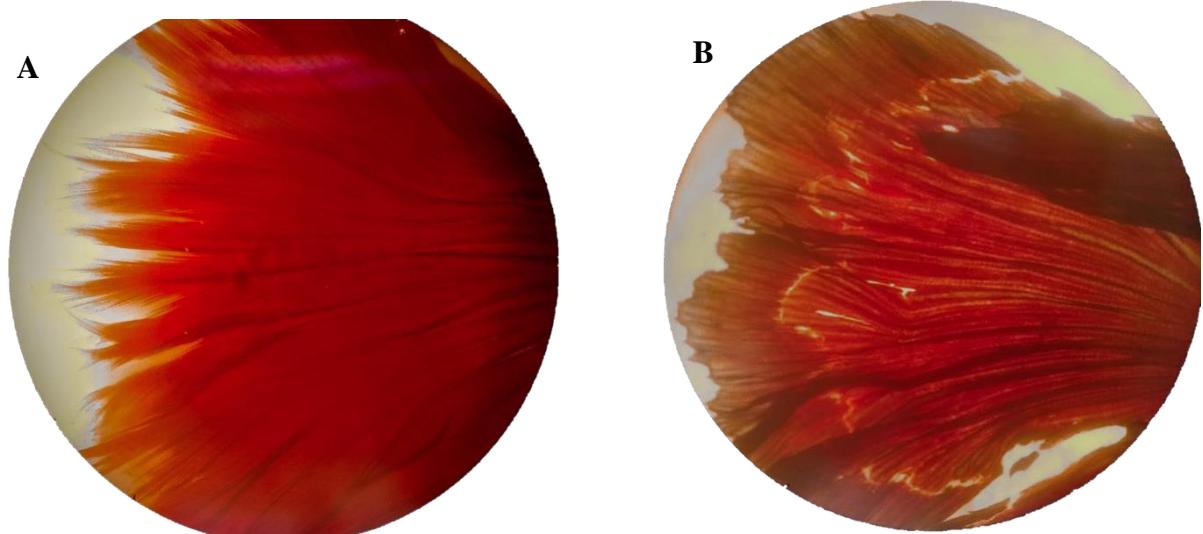


Figura 4. Nadadeira caudal de *B. splendens* macho do grupo controle (A), e em (B) macho exposto a $60 \mu\text{L L}^{-1}$ de OECS durante o ensaio de toxicidade aguda.

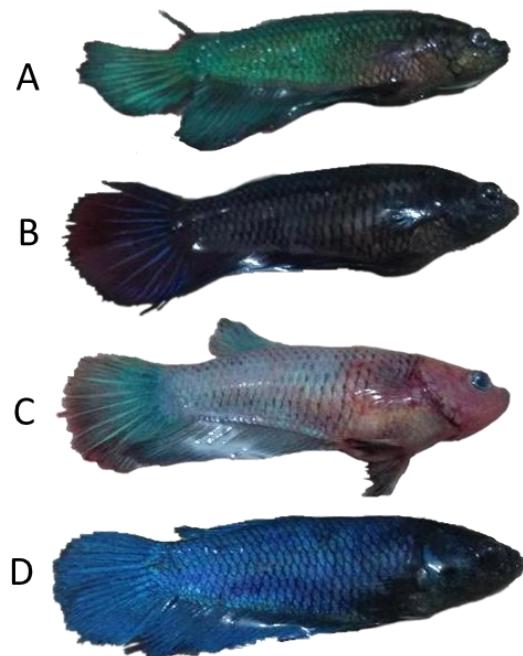


Figura 5. *B. splendens* fêmeas, após exposição a $60 \mu\text{l L}^{-1}$ do OECS durante o ensaio de toxicidade aguda. Observa-se a presença de abaulamento do abdômen (A, B, C) das fêmeas expostas ao OECS, além de alteração da coloração (A e C) em comparação com animal do grupo controle (D).

4.2 Indução a Anestesia e Recuperação

Em relação aos tempos de indução e recuperação da anestesia, foi possível observar que o aumento da concentração de OECS diminuiu significativamente o tempo necessário para sedação e indução a anestesia profunda e aumentou o tempo de recuperação (Figura 6). A anestesia foi alcançada com a utilização de $150 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS em 10 minutos, sendo que nesta concentração os peixes levaram até 5 minutos para recuperar da anestesia. O etanol na maior concentração utilizada ($2700 \mu\text{l L}^{-1}$) não produziu nenhum efeito anestésico nos animais. A indução a sedação e anestesia não foram acompanhadas por mortalidades dentro da faixa testada ou durante a recuperação, como também não foi observada mortalidade residual nas primeiras 48 h de observação após os experimentos.

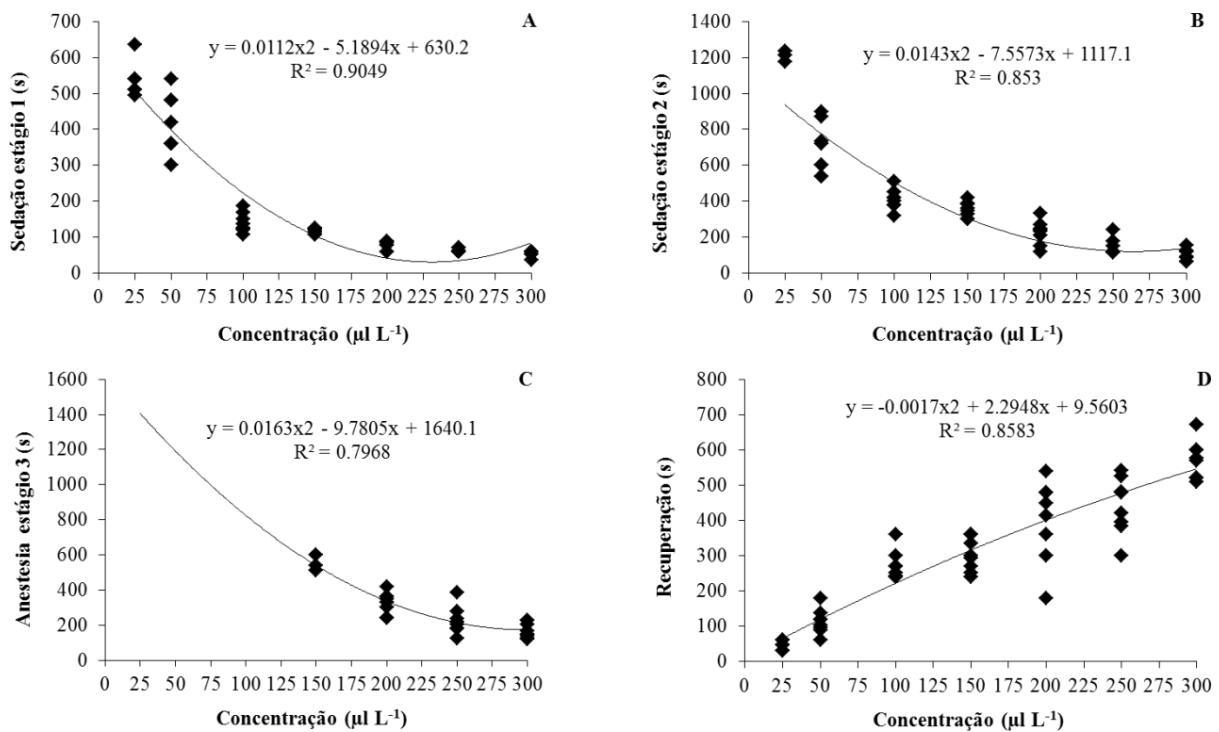


Figura 6. Sedação estágios I e II (A e B, respectivamente), indução a anestesia profunda (C) e tempos de recuperação (D) de *B. splendens* em diferentes concentrações de OECS.

4.3 Avaliação do Comportamento Agressivo do *B. splendens* Exposto ao OECS

Uma relação inversamente proporcional foi observada entre a concentração de OECS e a agressividade dos peixes, ou seja, quanto maior a dose utilizada menor a incidência de comportamentos hostis (Figura 7 A). Com relação à frequência respiratória aérea, a concentração de 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS proporcionou a menor frequência respiratória, quando comparada às demais concentrações avaliadas (Figura 7B).

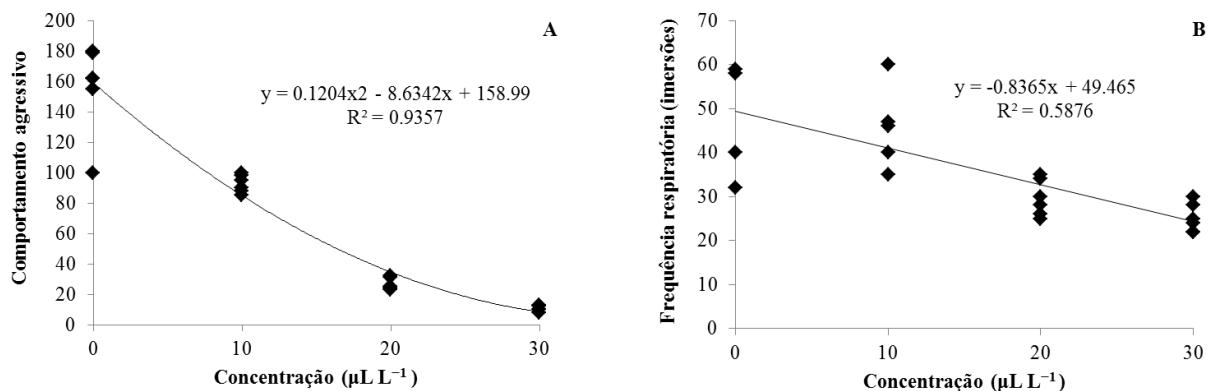


Figura 7. Comportamento agonista (A) e frequência respiratória aérea (B) de machos adultos de *B. splendens* durante 30 minutos de exposição a diferentes concentrações de OECS.

4.4 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de *B. splendens*

A concentração de $20 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS induziu apenas sedação nos peixes durante as seis horas de transporte. De modo geral os animais transportados em água sem a presença do OECS estavam mais agitados do que os peixes mantidos em $20 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS, estes primeiros ainda apresentaram alteração de cor e nadadeiras danificadas (Figura 8A). Não houve incidência de mortalidade dos peixes durante o transporte, assim como nas primeiras 48 h após a realização do experimento. A adição do OECS na água de transporte do *B. splendens* não alterou os parâmetros da água, para ambos os tratamentos foram obtidos níveis de oxigênio dissolvido de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, temperatura entorno de $25,7^\circ\text{C}$, pH 6,6, amônia total $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ N-NH₃ e amônia não ionizada $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ N-NH₃.

Após o procedimento experimental, nenhuma alteração a nível histológico foi observada em ambos os tratamentos (Figura 9). Pode-se observar os filamentos branquiais bem evidentes (Figura 9 – A e C), representando o tratamento controle sem a utilização do OECS e o grupo exposto ao OECS, assim como a lamela primária e secundária sem lesões (Figura 9 – B e D), correspondente ao grupo controle e tratado, respectivamente. Não foi possível observar hiperplasia do epitélio lamelar, assim como hiperplasia e hipertrófia de células do muco. Não foi observado também necrose ou degeneração em nenhum dos tratamentos.

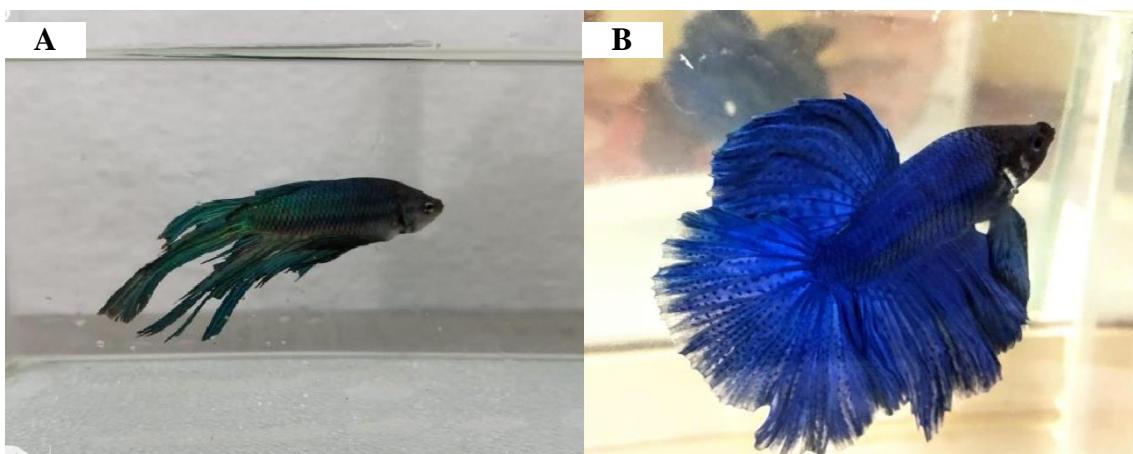


Figura 8. *B. splendens* macho do grupo controle (A), e (B) animal transportado em água contendo $20 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS (Silva, 2021).

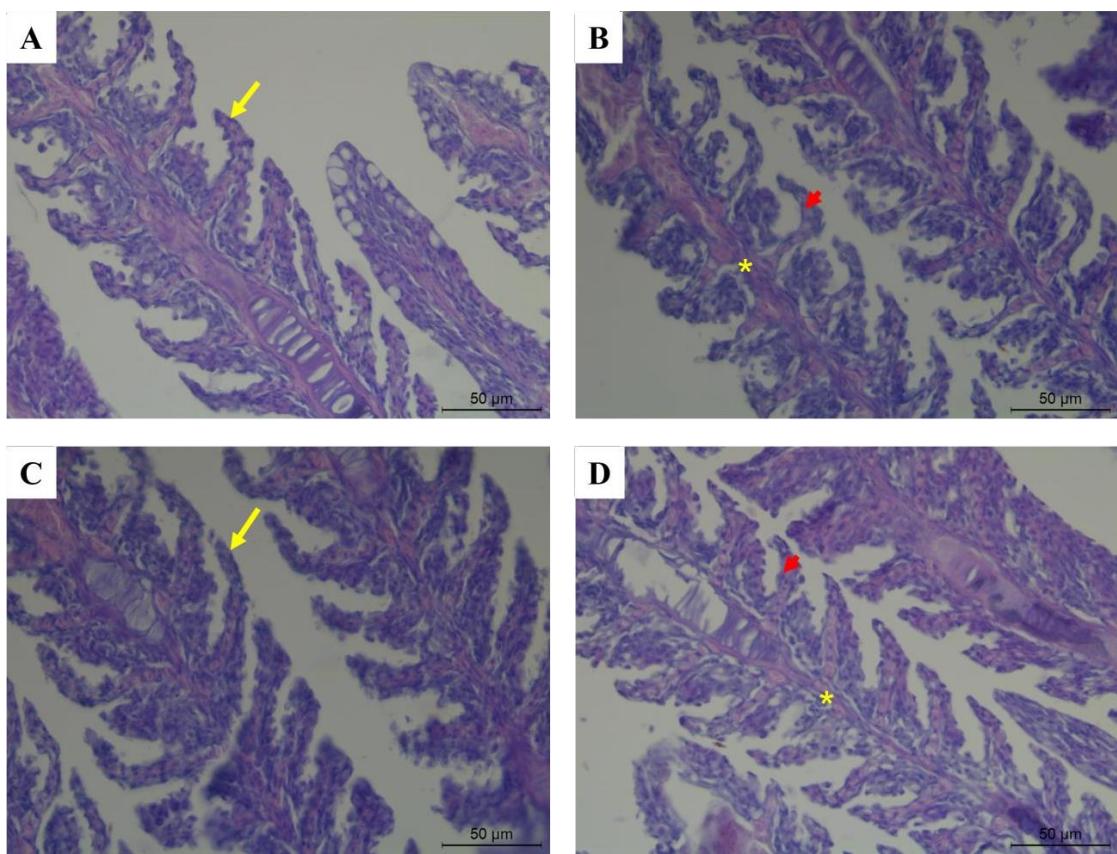


Figura 9. Corte longitudinal de filamentos branquiais de *B. splendens* expostos ao OECS. Imagens A e B correspondem ao tratamento controle ($0,0 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS), C e D correspondem ao grupo tratado ($20 \mu\text{l L}^{-1}$ de OECS). Legenda: Filamento branquial (seta amarela); Lamela primária (cabeça de seta vermelha); Lamela secundária (*) (Silva, 2021).

5 DISCUSSÃO

5.1 Toxicidade Aguda do OECS em *B. splendens*

Os anestésicos para peixes devem apresentar vários atributos, tais como curto tempo de indução e recuperação, efeitos fisiológicos não duradouros, eliminação rápida do corpo, alta solubilidade em água, disponibilidade, custo benefício e baixa ou nenhuma toxicidade para os peixes e manipuladores (BOLASINA et al., 2017). Nesse sentido, os OEs e extratos vegetais podem constituir uma alternativa valiosa aos anestésicos tradicionais, pois apresentam grande parte desses requisitos desejáveis (CAN et al., 2018; VANDERZWALMEN et al., 2020). No entanto, mesmo os OEs em determinadas concentrações podem apresentar alta toxicidade para os peixes levando-os a morte (WARISTHA et al., 2011; PATTANASIRI et al., 2017a), ou causar alterações histológicas graves nos tecidos branquiais dos peixes (BRANDÃO et al., 2021).

De acordo com os resultados obtidos, para o *B. splendens* a CL₅₀ em 48h de exposição ao OECS foi de 49,17 $\mu\text{L L}^{-1}$ e as maiores porcentagens de sobrevivência foram obtidas com a utilização de 20 e 30 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OE, 100 e 83 % respectivamente. Waristha et al. (2011), investigaram a toxicidade do OE de cravo em *B. splendens* machos aos seis meses de idade e observaram que a (CL_{50-96h}) de óleo de cravo foi de 26,3 ppm. Ao levarmos em consideração que os peixes pertenciam a mesma espécie e apresentavam idades semelhantes, sugerimos que o OECS pode ser menos tóxico para o *B. splendens* do que o óleo de cravo. Porém, se faz necessário levar em consideração o maior tempo de exposição dos peixes ao OE de cravo.

Em outro estudo Pattanasiri et al. (2017a) avaliaram diferentes concentrações de OE de cravo e eugenol quanto a toxicidade desses produtos para o *B. splendens* e encontraram a CL₅₀ de 48h de óleo de cravo e eugenol na faixa de 30,63 mg L^{-1} e, 29,95 mg L^{-1} , respectivamente.

5.2 Indução a Anestesia e Recuperação

Quanto aos tempos de indução e recuperação da anestesia, Ross e Ross, (2008) afirmam que a anestesia deve ocorrer preferencialmente em menos de 3 minutos e o tempo de recuperação não deve ultrapassar 5 minutos. A menor concentração de OECS utilizada no presente estudo (25 $\mu\text{L L}^{-1}$), causou apenas sedação leve no *B. splendens* em aproximadamente 8,3 minutos e uma concentração de 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi necessária para induzir anestesia profunda nesta espécie em 10 minutos. Waristha et al. (2011) encontrou um tempo de indução a sedação semelhante para o *B. splendens* com 20 ppm de OE de cravo, aproximadamente 12 minutos. Pattanasiri et al. (2017a), estudaram os efeitos sedativos e anestésicos do OE de cravo e eugenol em *B. splendens* e observaram que 25 mg L^{-1} de ambos os produtos pode levar os peixes a sedação em 18,7 minutos e 13,7 minutos, respectivamente, assim como, 50 mg L^{-1} dos dois anestésicos pode causar anestesia profunda em 20 minutos.

Os resultados obtidos mostram que o OECS pode proporcionar tempos de indução a sedação ideais para o *B. splendens*. Porém, a menor concentração anestésica de OECS 150 $\mu\text{L L}^{-1}$ não atendeu aos requisitos de Ross e Ross, (2008), porque proporcionou um tempo de indução elevado. Lopes et al. (2018), também encontraram tempos de indução elevados para o *Rhamdia queelen* anestesiado com 400, 600 e 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OE de *Citrus x aurantium*, de acordo com os autores a maior concentração de OE de *Citrus x aurantium* utilizada 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ proporcionou o melhor tempo de indução nesta espécie, cerca de 8,2 minutos.

A concentração de 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS produziu anestesia no *B. splendens* em um tempo mais apropriado (cerca de 3,3 minutos), mas o uso desta concentração resultou em um

tempo de recuperação acima do recomendado, 8,3 minutos. Muito embora 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OECS tenha proporcionado um tempo de recuperação acima do recomendado, tal concentração não pode ser considerada inadequada para o *B. splendens*, pois, há evidências de que a espécie pode necessitar de um tempo maior para se recuperar da anestesia, devido a sua resposta metabólica mais lenta, e além disso, cinco minutos é um valor de referência recomendado para outras espécies de metabolismo mais ativo, como a truta arco-íris (FABREGAT et al., 2015).

Uma particularidade importante do beta refere-se a sua capacidade de respirar ar atmosférico (ALTON et al., 2013), o que possivelmente pode ter interferido na forma como o OECS foi absorvido, e por isso foram necessárias concentrações de OECS mais elevadas para obter respostas anestésicas adequadas para esta espécie (FABREGAT et al., 2015). De acordo com Lopes et al. (2018), os efeitos sedativos e anestésicos dos OEs cítricos em peixes são causados por interações aditivas e/ou sinérgicas entre diversos compostos, como o limoneno, β -pineno, α -pineno e γ -terpineno. O limoneno tem sido apontado como um dos principais componentes dos OEs envolvidos na anestesia de peixes (BECKER et al., 2018). Aparentemente esse composto pode ligar-se diretamente ao receptor adenosina A_{2A}, produzindo os efeitos anestésicos nos peixes (LOPES et al., 2018). Segundo Almeida et al. (2018) o OE de *Aloysia triphylla* contendo 21,6 % de limoneno foi efetivo em anestesiar o *Serrasalmus rhombeus*. E, além disso, o OE de *Cinnamomum camphora* que apresentou 30 % de limoneno produziu diferentes estágios anestésicos em *Amphiprion ocellaris* (PEDRAZZANI e NETO, 2014). No presente estudo o OECS utilizado apresentou 93,2 % de limoneno, assim, seu efeito anestésico em *B. splendens* era esperado.

Os nossos resultados evidenciaram ainda a existência de uma relação inversa entre a concentração de OE usada e o tempo de indução, ou seja, à medida que foi aumentada a concentração de OECS, os tempos de indução foram decrescendo. Em relação à recuperação, foi observado um efeito oposto ao da indução, pois quanto maior a concentração, maior foi o tempo despendido para os peixes atingirem a recuperação total. Nesse sentido, resultados semelhantes de indução e recuperação anestésica já haviam sido relatados para outras espécies de peixes ornamentais como *Carassius auratus* com o OE de *Aniba rosaeodora* (KIZAK et al., 2018), *Sciaenochromis fryeri* e *Labidochromis caeruleus* com OE de *Pelargonium graveolens* (CAN et al., 2018) e *Aulonocara nyassae* a partir da utilização da benzocaína e do mentol (FERREIRA et al., 2020).

5.3 Avaliação do Comportamento Agressivo do *B. splendens* Exposto ao OECS

Através de análises comportamentais foi possível identificar que o comportamento agressivo do *B. Splendens* durante a interação entre machos foi significativamente reduzido em comparação com o grupo controle. Portanto este resultado sugere que o OECS pode diminuir a pré-disposição do *B. splendens* a agressão.

Em betas, recentemente foi observado que o comportamento agressivo é fruto de uma estrutura poligênica (ZHANG et al., 2021), e também associado a diversos fatores neuro-fisiológicos. Nesse mesmo trabalho, os autores hipotetizam que, durante a briga entre dois exemplares, há um aumento na respiração aérea dos animais, e esse comportamento é relacionado à maior eficiência em manter um metabolismo associado ao lactato, em virtude da maior necessidade de contração muscular responsável pelos ataques.

E este foi o primeiro trabalho onde há a descrição do uso de um óleo essencial na redução da agressividade em peixes. O uso do OECS minimizou a incidência de comportamentos agressivos do *B. splendens*, logo, a demanda por oxigênio pode não ter sido alterada e consequentemente os peixes emergem menos a superfície da água para captar oxigênio (CASTRO et al., 2006), como visto no presente estudo. O OECS também pode ter influenciado os peixes através de seus efeitos sedativos, pois ao serem sedados os peixes

tendem a diminuir a atividade respiratória em detrimento da desaceleração do seu metabolismo (TEIXEIRA et al., 2017). Similarmente ao que foi observado no presente estudo, Vanderzwalmen et al. (2020) mostraram que um condicionador de água a base de plantas, principalmente *Aloe vera*, diminuiu significativamente a prevalência de comportamentos agressivos em *Poecilia reticulata* submetidos a um transporte simulado em laboratório, bem como reduziu a agressividade em *Xiphophorus variatus*, após um transporte internacional.

Sabe-se que o uso da fluoxetina, um inibidor da serotonina, auxilia também na redução do comportamento agressivo em betas (EISENREICH e SZALDA-PETREE, 2015). Futuros estudos devem ser feitos para elucidar os mecanismos genéticos e metabólicos que agem na redução desse comportamento em peixes.

5.4 Transporte e Efeitos do OECS nas Alterações Histológicas na Brânquia de *B. splendens*

De acordo com Becker et al. (2012), as concentrações anestésicas usadas durante o transporte de peixes deve induzir, no máximo, o estágio 2 da anestesia (estágio de sedação profunda). Porque a sedação leve permite que os peixes mantenham o equilíbrio, a atividade de natação e a respiração (SANTOS et al., 2020). Além disso, as concentrações sedativas dos OEs são suficientes para melhorar alguns indicadores fisiológicos durante o transporte de peixes, contribuindo para a manutenção do estado de homeostase (SALBEGO et al., 2017). O OECS na concentração utilizada ($20 \mu\text{l L}^{-1}$) promoveu sedação leve no *B. splendens*. Os peixes apresentaram menos respostas a estímulos externos, porém mantiveram o equilíbrio e a atividade natatória normal. Peixes em sedação profunda tendem a perder o equilíbrio, a capacidade de natação e podem morrer por sufocamento ao permanecerem no fundo do recipiente de transporte (PARODI et al., 2014). Sedação semelhante foi observada em *B. splendens* transportado com o óleo de cravo (10 mg L^{-1}) (PATTANASIRI et al. 2017b) e em *Rhamdia quelen* com a utilização do eugenol (1,5 ou $3,0 \mu\text{l L}^{-1}$) ou óleo essencial de *Lippia alba* (10 ou $20 \mu\text{l L}^{-1}$) (SALBEGO et al., 2017).

B. splendens são conhecidos por causa de sua agressividade, extremamente territorialistas, os machos desta espécie podem iniciar lutas agressivas na defesa de seu território (CRAFT et al., 2003; CASTRO et al., 2006). As interações agnósticas em machos dessa espécie podem durar mais de uma hora, geralmente tais disputas envolvem exibições sociais estereotipadas com mordidas/golpes e bloqueios de boca (VU et al., 2021). Porém, em caso de lutas diretas podem ocorrer danos graves a um dos peixes, causando sua morte (CASTRO et al., 2006). Assim, devido à agressividade desses peixes convencionou-se embalar os machos desta espécie individualmente, para evitar lesões e estresse durante o transporte (FAO, 2010).

No presente estudo, os peixes mantidos em água sem a presença do OECS, apresentaram danos físicos, um alto nível de estresse e consequentemente alteração de cor, em virtude de intensas disputas entre os animais mantidos juntos. Portanto, a redução da agressividade, conforme observado com a adição do OECS é desejável, pois pode contribuir com a manutenção do bem-estar dos peixes e possibilitar o acondicionamento de mais de um *B. splendens* macho por saco plástico de transporte. Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Pattanasiri et al. (2017b), ao estudarem o efeito da adição do óleo essencial de cravo (10 mg L^{-1}) na água de transporte de *B. splendens* machos. Embora os autores não tenham realizado o transporte coletivo dos animais, ainda assim, os peixes do grupo controle apresentaram uma qualidade visual inferior em relação aos peixes transportados na presença do essencial. Similarmente, Wang et al. (2021) avaliaram a adição do eugenol (0, 10 e 20 mg L^{-1}) e timol (0, 10 e 20 mg L^{-1}) na água de transporte de juvenis de *Ictalurus punctatus*. Esses autores recomendaram a utilização de eugenol na faixa de 10 a 20 mg L^{-1} e timol na

concentração de 10 mg/L⁻¹ para transportar esta espécie a longas distâncias, uma vez que promoveram menores níveis de cortisol sérico nos peixes.

Além dos OEs, outros produtos a base de plantas apresentaram efeitos positivos, quando administrados a água de transporte de peixes vivos. Por exemplo, a utilização de um condicionador de água 260 µl L⁻¹ a base de *Aloe vera* durante um transporte simulado com duração de 1h, reduziu significativamente o número de mordidas em *Poecilia reticulata*. Em *Xiphophorus variatus* esse mesmo produto na concentração de 125 µl L⁻¹ causou níveis reduzidos de natação errática e comportamento agressivo, após um transporte internacional de aproximadamente 30h (VANDERZWALMEN et al. 2020).

De acordo com Lopes et al. (2018) o contato prolongado dos óleos cítricos com a água, pode resultar na alteração de alguns parâmetros, como uma redução no pH. A concentração de OECS utilizada no transporte experimental não causou mudanças na qualidade da água ou na taxa de mortalidade de *B. splendens* machos ao final do transporte. Em contraste com esses resultados, Pattanasiri et al. (2017b), obteve maiores níveis de oxigênio dissolvido, menores níveis de amônia não ionizada, uma redução do pH da água e uma menor taxa de mortalidade para *B. splendens* transportados em água contendo óleo essencial de cravo. A manutenção do pH observada no presente estudo pode ter ocorrido em virtude da respiração facultativa aérea do beta em comparação a outras espécies de peixes estudadas anteriormente. Nesse caso, como não há a incorporação do CO₂ diretamente na água, não há dessa maneira a acidificação da água associada à dissolução desse composto em meio aquoso.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo é possível concluir que a CL₅₀ em 48h do óleo essencial de *Citrus sinensis* foi de 49, 17 $\mu\text{l L}^{-1}$. O óleo essencial de *Citrus sinensis* apresenta potencial para ser utilizado como agente sedativo e anestésico em *B. splendens*, proporcionando tempos de indução aceitáveis nesta espécie. Além disso, recomenda-se a concentração de 20 $\mu\text{l L}^{-1}$ de óleo essencial de *Citrus sinensis* para o transporte coletivo do *B. splendens*, pois tal concentração não causou mortalidades nem redução da qualidade visual dos animais transportados juntos, nem foram observadas alterações a nível histológico nas brânquias dos animais, bem como não afetou negativamente os parâmetros de qualidade de água após o transporte, apesar do tempo de recuperação estar acima do recomendado para peixes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.P.G.; HEINZMANN, B.M.; VAL, A.L.; BALDISSEROTTO, B. Essential oils and eugenol as anesthetics for *Serrasalmus rhombeus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 44, 44-50, 2018.
- ALTON, L.A.; PORTUGAL, S.J.; WHITE, C.R. Balancing the competing requirements of air-breathing and display behaviour during male-male interactions in Siamese fighting fish *Betta splendens*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 164, 363–367, 2013.
- BALDISSEROTTO, B.; BARATA, L.E.S.; SILVA, A.S.; LOBATO, W.F.F.; TONI, C.; SILVA, L.V.F. Anesthesia of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalmidae) with the essential oils of *Aniba rosaeodora* and *Aniba parviflora* and their major compound, linalool. **Neotropical Ichthyology**, 16, 128-170. 2018.
- BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; HELDWEIN, C.G.; ZEPPENFELD, C.C.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 38, 789– 796, 2012.
- BECKER, A.J.; FOGLIARINI, C.O.; SOUZA, C.F.; BECKER, A.G.; MOURÃO, R.H.V.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Ventilatory frequency and anesthetic efficacy in silver catfish, *Rhamdia quelen*: a comparative approach between different essential oils. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 47: e20170185, 2018.
- BOLASINA, S.N.; AZEVEDO, A.; PETRY, A.C. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. **Aquaculture Reports**, 6, 56–60, 2017.
- BRANDÃO, F.R.; FARIAS, C.F.S.; SOUZA, D.C.M.; OLIVEIRA, M.I.B.; MATOS, L.V.; MAJOLO, C.; OLIVEIRA, M.R.; CHAVES, F.C.M.; O'SULLIVAN, F.L.A.; CHAGAS, E.C. Anesthetic potential of the essential oils of *Aloysia triphylla*, *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* for *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, 534: 736275, 2021.
- CAN, E.; KIZAK, V.; CAN, S.S.; ÖZÇİÇEK, E. Anesthetic potential of geranium (*Pelargonium graveolens*) oil for two cichlid species, *Sciaenochromis fryeri* and *Labidochromis caeruleus*. **Aquaculture**, 491, 59-64, 2018.
- CASTRO, N.; ROS, A.F.H.; BECKER, K.; OLIVEIRA, R.F. Metabolic Costs of Aggressive Behavior in the Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*. **Aggressive Behavior**, 32, 474–480, 2006.
- CLOTFELTER, E.D.; O'HARE, E.P.; MCNITT, M.M.; CARPENTER, R.E. SUMMERS, C.H. Serotonin decreases aggression via 5-HT1A receptors in the fighting fish *Betta splendens*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 87, 222-231, 2007.
- COLYER, S.W.; JENKINS, C. Pheromonal control of aggressive display in siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Perceptual and Motor Skills**, 42, 47-54, 1976.
- CONCEA. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.cobea.org.br>. Acesso: em 10 de Jun de 2020.

CRAFT, B.B.; VELKEY II, A.J.; SZALDA-PETREE, A. Instrumental conditioning of choice behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behavioural Processes**, 63, 171– 175, 2003.

DOSOKY, N.S.; SETZER, W.N. Biological activities and safety of *Citrus spp.* essential oils. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, 1966, 2018.

DUARTE, J.S.; HONORATO, C.A.; SANTOS, T.R. Tempo de indução e recuperação à anestesia do eugenol para beta (*Bettas plendens*). **Revista brasileira ciência veterinária**, 22, 176-179, 2015.

EISENREICH, B.R.; SZALDA-PETREE, A. Behavioral effects of fluoxetine on aggression and associative learning in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behavioural Processes**. 121, 37-42, 2015.

EMBRAPA. Brasil é 13º na exportação de peixes ornamentais. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Brasília, 19 de Set. de 2018.

Disponível: www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/37829679/brasil-e-13-na-exportacao-de-peixes- ornamentais. Acesso em: 10 de Jul de 2020.

FABREGAT, T.E.H.P.; PEREIRA, M.M.; ASSAHINA, T.B.; BROGGI, J.A. Uso do eugenol em bettas: estudo de diferentes concentrações e administrações sucessivas, **Boletim do Instituto de Pesca**, 41, 365–371, 2015.

FAO. The ornamental fish trade. Production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. Globefish Research Programme, Rome. **Food and Agriculture Organization**, 102, 134, 2010.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 (SOFIA): Sustainability in action. Rome. **Food and Agriculture Organization**, 2020.

FERNANDES, I.M.; BASTOS, Y.F.; BARRETO, D.S.; LOURENÇO, L.S.; PENHA. J. M. The efficacy of clove oil as anesthetic and in euthanasia procedure for small-sized tropical fishes. **Brazilian Journal of Biology**, 77, 444-450, 2017.

FERREIRA, A.L.; SILVA, W.S.; NEVES, L.C.; FERREIRA, N.S.; TAKATA, R.; LUZ, R.K. Benzocaine and menthol as anesthetics for the African cichlid *Aulonocara nyassae*. **Aquaculture International**. 28, 1837–1846, 2020.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. **Environmental Science & Technology**, 11, (7), 714-719, 1977.

KIZAK, V.; CAN, E.; DANABAŞ, D.; CAN, S.S. Evaluation of anesthetic potential of rosewood (*Aniba rosaeodora*) oil as a new anesthetic agent for goldfish (*Carassius auratus*). **Aquaculture**, 493, 296-301, 2018.

KOHLERT, J.G.; MANGAN, B.P.; KODRA, C.; DRAKO, L.; LONG, L.; SIMPSON, H. Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to Fluoxetine. **Psychological Reports**, 110, 1, 51-62, 2012.

LIMMA-NETTO, J.D.; SENA, A.C.; COPATTI, C.E. Essential oils of *Ocimum basilicum* and

Cymbopogon flexuosus in the sedation, anesthesia and recovery of tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). **Boletim do Instituto de Pesca**, 42, 727-733, 2016.

LOPES, J.M.; SOUSA, C.F.; SCHINDLER, B.; PINHEIRO, C.G.; SALBEGO, J.; SIQUEIRA, J.C.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Essential oils from *Citrus x aurantium* and *Citrus x latifolia* (Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, 16 (2), 2018.

MANNUCCI, C.; CALAPAI, F.; CARDIA, L.; INFERRERA, G.; ARENA, G. PIETRO, M.; NAVARRA, M.; GANGEMI, M.; SPAGNOLO, E.V.; CALAPAI, G. Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018, 18, 2018.

MARQUES, C.H.P. Caracterização do aquarismo marinho no estado do Ceará. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, CE, 2020. 81 f.

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 18, 73-90, 2004.

MIRGHAED, A.T.; GHELICHPOUR, M.; HOSEINI, S.M. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. **Aquaculture**, 464, 165–170. 2016.

NEVES, G.C.; SOUZA, C.F.; SANTOS, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; LOPES, J.M. Waterborne calcium and nitrite interaction: survival, growth, hematological and metabolic parameters in silver catfish. **Boletim do Instituto de Pesca**, 43, 408-416, 2017.

PARODI, T.V.; CUNHA, M.A.; BECKER, A.G.; ZEPPENFELD, C.C.; MARTINS, D.I.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L.G.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 40, 323–334, 2014.

PATTANASIRI, T.; TAPARHUEDEE, W.; SUPPAKUL, P. Acute toxicity and anesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Aquaculture International**, 25, 163-175, 2017a.

PATTANASIRI, T.; TAPARHUEDEE, W.; SUPPAKUL, P. Anaesthetic efficacy of clove oil-coated LDPE bag on improving water quality and survival in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*, during transportation. **Aquaculture International**, 25, 197–209, 2017b.

PAULA, M.S.; SILVA, J.A.; SANTOS, D.C.; JÚNIOR, I.F.; MELO, N.F.A.C.; COSTA, P.O. Caracterização do comércio varejista de peixes ornamentais na cidade de Belém – Pará. **Boletim Técnico Científico do CEPNOR**, 18, 33 - 38, 2018.

PEDRAZZANI, A.S.; OSTRENSKY NETO, A. The anaesthetic effect of camphor (*Cinnamomum camphora*), clove (*Syzygium aromaticum*) and mint (*Mentha arvensis*) essential oils on clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830). **Aquaculture Research**, 1–8, 2014.

- RIBEIRO, F.A.S.; JÚNIOR, J.R.C.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAYAMA, L. O comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da AQUICULTURA**, 11, 54-59, 2008.
- ROSS, L.G., ROSS B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed. Ames (IO): Blackwell Publishing.
- SALBEGO, J.; TONI, C.; BECKER, A.G.; ZEPPENFELD, C.C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; HEINZMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Brazilian Journal of Biology**, 77, 696-702, 2017.
- SANTOS, B.D.; SILVA, M.C.G.; SANTOS, T.P.; SILVA, S.C.B.L.; CADENA, M.R.S.; CADENA, P.G. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 68, 387-396, 2016.
- SANTOS, E.L.R.; REZENDE, F.P.; MORON, S.E. Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. **Aquaculture**, 523; 735164, 2020.
- SILVA, J.G.S.; REBELLATO, A.P.; GREINER, R.; PALLONEA, J.A.L. Bioaccessibility of calcium, iron and magnesium in residues of citrus and characterization of macronutrients. **Food Research International**, 97, 162-169, 2017.
- SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, 218, 177-185, 2003.
- TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* is effective in nile tilapia transport. **Boletim do Instituto de Pesca**, 44, 17-24, 2017.
- VANDERZWALMEN, M.; EDMONDS, E.; CAREY, P.; SNELLGROVE, D.; SLOMAN, K.A. Effect of a water conditioner on ornamental fish behavior during commercial transport. **Aquaculture**, 514: 734486, 2020.
- VU, T.; IWASAKI, Y.; OSHIMA, K.; CHIU, M.; NIKAIDO, M.; OKADA, N. A unique neurogenomic state emerges after aggressive confrontations in males of the fish *Betta splendens*. **Gene**, 784: 145601, 2021.
- WANG, J.; XIONG, G.; BAI, C.; LIAO, T. Anesthetic efficacy of two plant phenolics and the physiological response of juvenile *Ictalurus punctatus* to simulated transport. **Aquaculture**, 538: 736566, 2021.
- WARISTHA, A.; KINGKAEW, W.; KUMTHORN, T. Acute Toxicity of Clove Oil and Effects on Histopathological Changes in Gill of Siamese fighting Fish *Betta Splendens*. **Research Journal of Chemistry and Environment**, 15, 139-146, 2011.
- WATSON, C.; DIMAGGIO, M.; HILL, J.; TUCKETT, Q.; YANONG, R. Evolution, culture, and care for *betta splendens*. **EDIS**, 2019.
- ZAHL, I.H.; SAMUELSEN, O.; KIESSING, A. Anesthesia of farmed fish: implications for

welfare. **Fish Physiol Biochem**, 38, 201-218, 2012.

ZHANG, W.; WANG, H.; BRANDT, D.Y.C.; HU, B.; SHENG, J.; WANG, M.; LUO, H.; GUO, S.; SHENG, B.; ZENG, Q.; PENG, K.; ZHAO, D.; JIAN, S.; WU, D.; WANG, J.; ESCH, J.H.M.V.; SHI, W.; REN, J.; NIELSEN, R.; HONG, Y. The genetic architecture of phenotypic diversity in the betta fish (*Betta splendens*). **BioRxiv**, 443352, 2021.

ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; VERAS, G.C.; TAVARES, M.M.; CHAVES, W. Tolerância aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens*, à salinidade da água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 2106-2110, 2009.