

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE

Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

Óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para *Oreochromis niloticus*

Maira Sabrina Milanese

Araquari, 2024

Maira Sabrina Milanese

Óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para *Oreochromis niloticus*

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Robilson Antônio Weber

Coorientadores: Dra. Jaqueline Inês Alves de Andrade

Msc. Deivison Ferreira da Silva

Araquari, 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

M637Ó Milanese, Maira Sabrina
Óleo essencial de Cinnamomum zeylanicum como
anestésico para Oreochromis niloticus / Maira Sabrina
Milanese; orientador Robilson Antônio Weber;
coorientadora Jaqueline Inês Alves de Andrade;
coorientador Deivison Ferreira da Silva. -- Araquari,
2024.
51 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, , Araquari, 2024.

Inclui referências.

1. Anestesia. 2. Bem-estar. 3. Cortisol. 4.
Estresse. 5. Glicose. I. Weber, Robilson Antônio, II.
Andrade, Jaqueline Inês Alves de. III. Silva,
Deivison Ferreira da. IV. Instituto Federal
Catarinense. . V. Título.

MAIRA SABRINA MILANESE

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum* COMO ANESTÉSICO PARA
Oreochromis niloticus.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal) e aprovada em sua forma final pelo curso de Mestrado em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*.

Prof. Robilson Antônio Weber, Dr.
Instituto Federal Catarinense



Documento assinado digitalmente
ROBILSON ANTONIO WEBER
Data: 13/08/2024 11:59:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
IVAN BIANCHI
Data: 13/08/2024 12:04:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Ivan Bianchi, Dr.
Coordenador Mestrado Produção e Sanidade Animal Instituto Federal Catarinense

BANCA EXAMINADORA

Prof. Artur de Lima Preto, Dr.
Instituto Federal Catarinense

Prof.^a Gisele Cristina Favero, Dra.
Universidade Federal de Minas Gerais

Araquari

2024

Maira Sabrina Milanese

Óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para *Oreochromis niloticus*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 29/07/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Robilson Antônio Weber (Orientador)

**Doutor em Aquicultura pela Universidade de Santiago de Compostela
Instituto Federal Catarinense**

Prof. Dr. Artur de Lima Preto

**Doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Carlos
Instituto Federal Catarinense**

Prof. Dra. Gisele Cristina Favero

**Doutora em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista
Universidade Federal de Minas Gerais**

Agradecimentos

Aos meus pais, Fabrizio e Tânia, por seu amor incondicional, apoio constante e por acreditarem em mim em todas as etapas da minha vida. Sua orientação e sacrifício foram essenciais para a minha formação.

Ao meu marido, Pedro, por seu amor, apoio incondicional e por estar sempre ao meu lado. Sua paciência, compreensão e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e por ser minha fonte constante de força e inspiração.

Ao meu filho, que este trabalho seja uma prova de que, com dedicação e esforço, é possível alcançar nossos sonhos. Que você cresça sabendo que foi uma fonte de motivação e alegria durante todo este processo.

Ao meu irmão e à minha avó, Bruno e Lily, por seu amor, apoio e inspiração constantes. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Agradeço a todos os meus familiares pelo suporte incondicional e por acreditarem em mim.

Aos meus amigos e colegas, que compartilharam comigo risos, desafios e momentos inesquecíveis durante esta jornada. A amizade de vocês tornou o caminho mais leve e agradável.

Ao meu orientador, Robilson, por sua paciência, ensinamentos, e por me guiar com sabedoria e dedicação ao longo deste percurso acadêmico. Sua orientação foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço também a todos os professores e profissionais do Instituto Federal Catarinense que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento desta pesquisa.

E, finalmente, a Deus, por me guiar e dar forças em todos os momentos.

***Não há limite para o que nós,
como mulheres, podemos realizar.
(Michelle Obama)***

Resumo

MILANESE, Maira Sabrina. **Óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para *Oreochromis niloticus***. 2024. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2024.

Na aquicultura, os peixes são frequentemente manipulados, o que provoca respostas fisiológicas de estresse, podendo resultar em imunodepressão, retardo do crescimento, dor e até morte. Para minimizar essas adversidades durante os manejos, o uso de anestésicos torna-se essencial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do uso do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para juvenis de *Oreochromis niloticus*. Foram realizados dois experimentos, sendo que o primeiro avaliou os tempos de indução e recuperação de nove concentrações do OEC (60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 e 140 $\mu\text{L L}^{-1}$) como anestésico (10 animais por tratamento) e, a partir da concentração ideal (100 $\mu\text{L L}^{-1}$), a qual induziu anestesia em até 3 minutos e recuperação em até 5 minutos, foi realizado o segundo experimento, em que foram avaliados os parâmetros sanguíneos e histopatológicos após exposição ao OEC. Desta forma, os peixes foram divididos em três grupos (9 animais por tratamento): controle (sem anestésico), T0 (amostrados imediatamente após a anestesia de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEC) e T1 (amostrados 1 hora após anestesia de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEC). Foram avaliados os níveis de glicose, lactato, cortisol, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além dos efeitos teciduais em brânquias e fígado. Os resultados mostraram que o OEC inibiu a resposta primária ao estresse, impedindo o aumento do cortisol. No entanto, o anestésico não inibiu o aumento dos níveis plasmáticos de glicose (não apresentando diferenças entre tratamentos e controle) e lactato (apenas em T0). Além disso, não ocorreu aumento das enzimas ALT e AST no tratamento T0, mas foi observado aumento significativo dessas enzimas no tratamento T1 quando comparado ao controle, sugerindo que a exposição repetida ao OEC pode causar dano ao tecido hepático. Com relação às análises histopatológicas, o OEC não provocou alteração do tecido hepático, mas resultou em congestão nos vasos lamelares e veia central dos tecidos branquiais. Este estudo concluiu que concentração de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEC é segura para promover anestesia em juvenis de *O. niloticus*, pois previne o aumento dos níveis de cortisol sanguíneos, minimizando o estresse dos animais.

Palavras-chave: anestesia; bem-estar; cortisol; estresse; glicose.

Abstract

MILANESE, Maira Sabrina. ***Cinnamomum zeylanicum* essential oil as anesthetic for *Oreochromis niloticus***. 2024. 51f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2024.

In aquaculture, fish are frequently handled, which induces physiological stress responses that can result in immunodepression, growth retardation, pain, and even death. To minimize these adversities during handling, the use of anesthetics becomes essential. The aim of this study was to evaluate the efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil (OEC) as an anesthetic for juvenile *Oreochromis niloticus*. Two experiments were conducted. The first experiment evaluated the induction and recovery times of nine concentrations of OEC (60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, and 140 $\mu\text{L L}^{-1}$) as an anesthetic (10 animals per treatment). Based on the optimal concentration (100 $\mu\text{L L}^{-1}$), which induced anesthesia within 3 minutes and recovery within 5 minutes, a second experiment was conducted to evaluate blood parameters and histopathological effects after exposure to OEC. In this experiment, the fish were divided into three groups (9 animals per treatment): control (no anesthetic), T0 (sampled immediately after anesthesia with 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ of OEC), and T1 (sampled 1 hour after anesthesia with 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ of OEC). The levels of glucose, lactate, cortisol, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were assessed, as well as the tissue effects on gills and liver. The results showed that OEC inhibited the primary stress response by preventing the increase in cortisol. However, the anesthetic did not inhibit the increase in plasma glucose levels (showing no differences between treatments and control) and lactate (only in T0). Additionally, there was no increase in ALT and AST enzymes in the T0 treatment, but a significant increase in these enzymes was observed in the T1 treatment compared to the control, suggesting that repeated exposure to OEC may cause liver tissue damage. Regarding histopathological analyses, OEC did not cause alterations in liver tissue but resulted in congestion of the lamellar vessels and central vein of the gill tissues. This study concluded that a concentration of 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ of OEC is safe to promote anesthesia in juvenile *O. niloticus* as it prevents the increase in blood cortisol levels, thus minimizing stress in the animals.

Keywords: anesthesia; cortisol; stress; glucose; well-being.

Lista de Figuras

- Figura 1 Exemplo de *Oreochromis niloticus* utilizado no experimento. 2
- Figura 2 Caracterização química do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.
Area %: porcentagem do componente no óleo essencial; R. Time: tempo de retenção; Name: nome do constituinte químico. 8
- Figura 3 Tempo de indução (A) e recuperação (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição à diferentes concentrações de óleo essencial de canela (OEC). 13
- Figura 4 Tempo de indução (A) e recuperação (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição à diferentes concentrações de óleo essencial de canela (OEC). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). 14
- Figura 5 Níveis séricos de cortisol em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). 15
- Figura 6 Níveis plasmáticos de glicose (A) e lactato (B) em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). 15
- Figura 7 Níveis de alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$). 16
- Figura 8 Fotomicrografia de secções de brânquias: tecido normal (10x) (A); presença de áreas multifocais com discreta/moderada hiperplasia do epitélio interlamelar (seta preta) e moderada congestão multifocal da

veia central (setas vermelhas) (10x) (B); presença de congestão difusa acentuada da veia central (seta azul) (40x) (C).

17

Figura 9 Fotomicrografia de secções do fígado: tecido normal (10x) (A); presença de degeneração vacuolar difusa acentuada, caracterizada por macro e microvacúolos citoplasmáticos e deslocamento do núcleo para a periferia celular (40x) (B); presença de degeneração vacuolar difusa acentuada e congestão multifocal moderada (seta preta) (10x) (C).

19

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Frequência de ocorrência de alterações nas brânquias encontradas em *Oreochromis niloticus* expostos a óleo essencial de canela a 100 $\mu\text{L L}^{-1}$. Controle (sem exposição a anestésico); T0 (amostrados imediatamente após a anestesia); T1 (amostrados 1 hora após anestesia inicial); n, número de animais; CG, congestionamento; HEL, hiperplasia do epitélio interlamelar; EE, elevação epitelial; FPAR, fusão parcial do epitélio lamelar. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$). 18
- Tabela 2 Frequência de ocorrência de alterações hepáticas encontradas em *Oreochromis niloticus* expostos a óleo essencial de canela a 100 $\mu\text{L L}^{-1}$. Controle (sem exposição ao anestésico); T0 (amostrados imediatamente após a anestesia); T1 (amostrados 1 hora após anestesia inicial); n, número de animais. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$). 18

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE	1
1.1	Aquicultura	1
1.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	1
1.3	Bem-estar na aquicultura	2
1.4	O estresse	2
1.5	Anestésico	3
1.6	Óleo essencial	3
1.7	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	4
2	OBJETIVOS	5
2.1	Geral	5
2.2	Específicos	5
3	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cinnamomum zeylanicum</i> COMO ANESTÉSICO PARA <i>Oreochromis niloticus</i>	6
3.1	Introdução	6
3.2	Material e métodos	7
3.2.1	Caracterização química do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	8
3.2.2	Experimento 1: Determinação dos tempos de indução e recuperação sob diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> como anestésico	9
3.2.3	Experimento 2: Avaliação de parâmetros sanguíneos e histopatológicos após exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	10
3.2.4	Análise estatística	11
3.3	Resultados	12
3.3.1	Experimento 1: Determinação dos tempos de indução e recuperação sob diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	

	como anestésico	12
3.3.2	Experimento 2: Avaliação de parâmetros sanguíneos e histopatológicos após exposição ao óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	14
3.4	Discussão	20
3.5	Conclusão	24
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
5	REFERÊNCIAS	26
6	ANEXOS	36

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

1.1 Aquicultura

O cultivo de organismos aquáticos é globalmente apoiado por motivos nutricionais e econômicos, oferecendo uma fonte de proteínas de baixo custo através da aquicultura, que em 2022 atingiu a marca de 130,9 milhões de toneladas cultivadas (FAO, 2024). Nesse mesmo ano, a produção aquícola superou pela primeira vez a produção pesqueira, com a aquicultura continental representando 62,6% do total de animais cultivados. As previsões apontam um incremento da produção até 2032, alcançando 205 milhões de toneladas, proporcionando não apenas benefícios alimentares, mas também econômicos (FAO, 2024). No Brasil, a produção de peixes cultivados em 2023 alcançou 887.029 toneladas, com crescimento de 3,1% em relação ao ano anterior (Peixe BR, 2024).

1.2 *Oreochromis niloticus*

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) é o peixe mais cultivado no Brasil e está entre os mais importantes na piscicultura mundial (FAO, 2024), sendo de interesse para o consumo humano por apresentar sabor agradável, fácil filetagem e preço competitivo. *O. niloticus* é cultivado em viveiros de terra e tanque-rede em reservatórios públicos ou privados, com as principais linhagens sendo Chitralada e Gift, muitas vezes produzidas simultaneamente em uma mesma propriedade (Valenti *et al.*, 2021).

Em 2023 foram produzidas em todo o país 579.080 toneladas de tilápias, volume que representa 65,3% da produção nacional de peixes de cultivo e aumento de 5,28% sobre as 550.060 toneladas de 2022 (Peixe BR, 2024). O Paraná destaca-se como maior produtor do Brasil, com mais de 36% do volume total. Em 2023, o estado cultivou 209.500 toneladas da espécie, aumento de 11,5% em relação ao ano anterior (Peixe BR, 2024).

A utilização de anestésicos para os diversos manejos realizados com as tilápias torna-se essencial pois, além de promover a redução do estresse, evita acidentes e aumenta a segurança do trabalho dos técnicos (Vidal, 2008), pois um dos problemas da espécie é a presença de espinhos ósseos nas nadadeiras, os quais podem ocasionar sérios ferimentos nas pessoas que a manipula.



Figura 1: Exemplo de *Oreochromis niloticus* utilizado no experimento.

1.3 Bem-Estar na aquicultura

Na era do Antropoceno, a crescente atenção ao bem-estar dos peixes em ambientes artificiais é evidente, especialmente diante do aumento global da aquicultura (Saraiva & Arechevala-Lopes, 2019). Pesquisas recentes destacam a sensibilidade dos peixes, reconhecendo sua capacidade de sentir dor, medo e expressar comportamentos complexos (Bshary *et al.*, 2014; Sneddon & Brown, 2020). Fatores estressores como confinamento, abate e interações agressivas impactam negativamente o bem-estar (Ellis *et al.*, 2007), dessa forma a busca por soluções para minimizar estas situações é fundamental para aprimorar a qualidade de vida desses animais em ambientes artificiais (Gauy, 2022).

1.4 O estresse

A primeira definição de estresse no campo da medicina surgiu com Hans Selye (1956) e o descreveu como “resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda”. Atualmente, o estresse é definido como um estado de desafio da homeostase, incluindo tanto o estresse sistêmico quanto o estresse local (Lu *et al.*, 2021).

As respostas ao estresse são categorizadas em primárias, secundárias e terciárias (Barton & Iwama, 1991; Iwama *et al.*, 2004). As respostas primárias envolvem a liberação de catecolaminas e corticosteroides, sendo o cortisol frequentemente adotado como indicador principal (Gamperl *et al.*, 1994). Quanto às respostas secundárias, estas se referem a modificações nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, destacando-se os níveis da glicose e

do lactato plasmático como indicadores. Por fim, diante de situações prolongadas de estresse, emergem as respostas terciárias, caracterizadas por imunossupressão, impacto negativo no crescimento, desempenho reprodutivo comprometido e alterações comportamentais (Brandão *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2006; Balasch & Tort, 2019).

1.5 Anestésico

Com o crescimento do setor de aquicultura os procedimentos rotineiros da cadeia produtiva expõem os peixes a fatores estressores, desencadeando respostas fisiológicas de estresse que podem contribuir para um menor desempenho do animal. Com o objetivo de mitigar essas adversidades nos procedimentos, a aplicação de anestésicos torna-se comum (Silva *et al.*, 2021). A anestesia proporciona uma resposta menos reativa dos peixes a estímulos prejudiciais, resultando em maior tranquilidade durante o manejo, transporte e eventual realização de cirurgias (Hoseini *et al.*, 2015; Barata *et al.*, 2016; Mazandarani *et al.*, 2017).

A aplicação de anestésicos não apenas previne possíveis danos físicos nos peixes, mas também é esperado que atenuem as respostas fisiológicas ao estresse (Weber *et al.*, 2009). O anestésico ideal deve induzir a anestesia em até três minutos e permitir a recuperação em até e cinco minutos. Além disso, é crucial que o anestésico não apresente toxicidade para os peixes (Marking & Meyer, 1985; Weber *et al.*, 2009).

1.6 Óleo essencial

Os anestésicos podem ser categorizados em derivados de plantas e não derivados de plantas (Hoseini *et al.*, 2018). Em busca de alternativas mais acessíveis para a sedação e anestesia de peixes, tem-se explorado opções que não envolvam o uso de substâncias sintéticas. Diversos estudos têm corroborado quanto a eficácia dos óleos essenciais (OEs) como agentes anestésicos em peixes (Weber *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2018; Hoseini *et al.*, 2018; Aydin & Barbas, 2020; Aydin & Orhan, 2021; Silva *et al.*, 2021).

A indução de anestesia ou sedação por meio da aplicação de óleos essenciais extraídos de plantas pode decorrer diretamente da ação de um composto principal, da interação entre várias substâncias ativas, ou da manifestação de efeitos sinérgicos (Heldwein

et al., 2014). Essa ação anestésica pode ser implementada de duas formas: por meio de administração injetável ou pela imersão dos peixes em uma solução anestésica, onde o anestésico é absorvido pelas brânquias, difundido para o sangue e transportado até o sistema nervoso central (Ross & Ross, 2008).

1.7 *Cinnamomum zeylanicum*

A canela é uma especiaria utilizada globalmente por séculos, derivada da casca de árvores pertencentes ao gênero *Cinnamomum*, sendo *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* as principais espécies (Ranasinghe *et al.*, 2013). O *Cinnamomum zeylanicum* é nativo do Sri Lanka e partes sul da Índia (Paranagama *et al.*, 2010). Na medicina humana, pesquisas destacam as propriedades medicinais da canela, incluindo efeitos anti-inflamatórios, atividade antimicrobiana, redução de doenças cardiovasculares, melhoria da função cognitiva e redução do risco de câncer de cólon (Agasthya *et al.*, 2009; Ranasinghe *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* são conhecidos por suas propriedades farmacêuticas, entretanto, estudos que investigam o uso desses óleos na aquicultura são escassos (Bandeira Junior *et al.*, 2022), assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico em *Oreochromis niloticus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a eficácia do uso do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para juvenis de *Oreochromis niloticus*.

2.2 Específicos

- Avaliar a concentração ideal do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* para produzir efeito anestésico em juvenis de *Oreochromis niloticus*.

- Avaliar os níveis de cortisol, glicose, lactato e as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) sanguíneos em juvenis de *Oreochromis niloticus* submetidos a anestesia com o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

- Avaliar os efeitos histopatológicos nas brânquias e fígado de juvenis de *Oreochromis niloticus* após anestesia com o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum* COMO ANESTÉSICO PARA *Oreochromis niloticus*.

Autores

Maira Sabrina MILANESE^{1,2,3}, Gabriel Tobias DESCHAMPS¹, Deivisson Ferreira da SILVA³, Juliano Pereira TERRA⁴, Jaqueline Inês Alves de ANDRADE^{1,2,3}, Robilson Antônio WEBER^{1,2,3}

¹ Laboratório de Aquicultura. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC, Araquari, SC 89245-000, Brasil

² Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC, Araquari, SC 89245-000, Brasil

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – IFC, Araquari, SC 89245-000, Brasil

⁴ Laboratório de Diagnóstico Patológico Veterinário. Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF 70910-900, Brasil

3.1 Introdução

A crescente atenção ao bem-estar dos peixes em ambientes artificiais é evidente, especialmente diante do aumento global da aquicultura (Saraiva & Arechevala-Lopes, 2019). Pesquisas destacam a sensibilidade dos peixes, reconhecendo sua capacidade de sentir dor, medo e expressar comportamentos complexos (Bshary *et al.*, 2014; Sneddon & Brown, 2020) legitimando a aplicação dos conceitos de bem-estar neste grupo.

Com o crescimento da aquicultura, os procedimentos rotineiros de manejo expõem os organismos aquáticos a diversos fatores estressores, os quais desencadeiam respostas fisiológicas que podem contribuir para o comprometimento do sistema imunológico, reprodutiva e de crescimento dos animais (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999; He *et al.*, 2020). Com o objetivo de minimizar essas adversidades, a aplicação de anestésicos tem se tornado comum e essencial (Silva *et al.*, 2021). A anestesia proporciona uma resposta menos reativa dos peixes a estímulos prejudiciais, resultando em maior tranquilidade

durante o manejo, transporte e eventual realização de cirurgias (Hoseini *et al.*, 2015; Barata *et al.*, 2016; Mazandarani *et al.*, 2017).

O anestésico ideal deve induzir a anestesia em até três minutos e permitir a recuperação completa em até cinco minutos. Além disso, é crucial que o anestésico não apresente toxicidade para os peixes (Marking & Meyer, 1985; Weber *et al.*, 2009). A indução de anestesia ou sedação por meio da aplicação de óleos essenciais extraídos de plantas pode decorrer diretamente da ação de um composto principal, da interação entre várias substâncias ativas, ou da manifestação de efeitos sinérgicos (Heldwein *et al.*, 2014). Diversos estudos têm mostrado a eficácia dos óleos essenciais (OEs) como agentes anestésicos em diferentes espécies de peixes (Weber *et al.*, 2009; Correia *et al.*, 2018; Hoseini *et al.*, 2018; Aydin & Barbas, 2020; Aydin & Orhan, 2021; Silva *et al.*, 2021).

O *Cinnamomum zeylanicum* (popularmente conhecido como canela) é nativo do Sri Lanka e sul da Índia (Paranagama *et al.*, 2010) e é conhecido na medicina humana pelas suas propriedades, incluindo efeitos anti-inflamatórios, atividade antimicrobiana, redução de doenças cardiovasculares, melhoria da função cognitiva e redução do risco de câncer de cólon (Agasthya *et al.*, 2009; Ranasinghe *et al.*, 2013). Entretanto, estudos que investigam o uso dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para peixes são escassos (Bandeira Junior *et al.*, 2022). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico para juvenis de *Oreochromis niloticus*.

3.2 Material e métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Organismos Aquáticos do Instituto Federal Catarinense, campus Araquari localizado no estado de Santa Catarina, Brasil. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – protocolo número 426/2023.

Os espécimes, *Oreochromis niloticus*, foram adquiridos de uma piscicultura comercial. O arraçoamento ocorreu duas vezes ao dia com ração comercial (Peixecol 32% - níveis de garantia: proteína bruta: 320 g kg⁻¹, extrato etéreo: 50 g kg⁻¹, matéria fibrosa: 60 g kg⁻¹, matéria mineral: 120 g kg⁻¹) até a saciedade. A limpeza dos tanques era realizada diariamente e os animais foram privados de alimentação 24 horas antes dos experimentos.

3.2.1 Caracterização química do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

O óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* foi adquirido comercialmente (TERRA FLOR INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE AROMATERÁPICOS LTDA). A caracterização química do óleo essencial, disponibilizada pelo fornecedor comercial, foi determinada por cromatografia gasosa do Lote Fornecedor J0D1130K e Lote Terra Flor 21100. A Figura 2 mostra as análises qualitativas e quantitativas do óleo essencial de *C. zeylanicum*, onde observam-se como principais componentes o Eugenol (76,35%), beta-Caryophyllene (6,96%), Linalool (3,24%), Benzyl benzoate (3,17%), Eugenyl acetate (2,49%), alpha-Phellandrene (2,06%), (E)-Cinnamyl acetate (1,43%) e (E)-Cinnamaldehyde (1,04%).

Peak Report TIC					
R.Time	Name	Area%	R.Time	Name	Area%
14.875	alpha-Pinene	0.02	37.513	(E)-Cinnamaldehyde	1.04
15.866	Camphene	0.01	38.684	Safrole	0.40
16.520	Benzaldehyde	0.04	39.770	(E)-Cinnamyl alcohol	0.02
17.542	beta-Pinene	0.03	42.490	alpha-Cubebene	0.01
18.133	Myrcene	0.09	43.048	Eugenol	76.35
18.843	2-Carene	0.01	43.833	Hydrocinnamyl acetate	0.05
19.309	alpha-Phellandrene	2.06	44.429	alpha-Copaene	0.29
19.467	delta-3-Carene	0.07	45.270	beta-Elemene	0.01
19.994	alpha-Terpinene	0.05	45.803	Methyleugenol	0.01
20.493	para-Cymene	0.14	46.287	cis-beta-Caryophyllene	0.01
20.811	Limonene	0.42	47.267	beta-Caryophyllene	6.96
20.935	beta-Phellandrene	0.04	48.409	Aromadendrene	0.02
21.025	1,8-cineole	0.44	48.662	(E)-Cinnamyl acetate	1.43
21.875	trans-beta-Ocimene	0.00	49.472	alpha-Humulene	0.26
22.746	gamma-Terpinene	0.00	50.611	Germacrene D	0.01
23.571	cis-Linalool oxide (furanoid)	0.01	51.527	beta-Selinene	0.00
24.626	Terpinolene	0.03	51.638	Viridiflorene	0.03
25.543	Linalool	3.24	51.916	Bicyclogermacrene	0.03
25.747	Unidentified	0.02	52.061	alpha-Muurolene	0.01
29.893	Benzyl acetate	0.03	52.883	Eugenyl acetate	2.49
30.668	Borneol	0.02	53.228	delta-Cadinene	0.05
30.765	Unidentified	0.00	56.719	Spathulenol	0.02
31.251	Terpinen-4-ol	0.03	57.060	Caryophyllene oxide	0.19
31.645	para-Cymen-8-ol	0.01	58.671	Humulene epoxide II	0.04
32.239	alpha-Terpineol	0.13	60.179	Unidentified	0.01
32.800	alpha-Phellandrene epoxide	0.01	61.188	Unidentified	0.02
34.561	Hydrocinnamic alcohol	0.02	62.004	14-Hydroxy-9-epi-Z-Caryophyllene	0.02
35.986	Chavicol	0.06	67.200	Benzyl benzoate	3.17
36.201	2-Phenethyl acetate	0.01			100.00

Figura 2: Caracterização química do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*. Area %: porcentagem do componente no óleo essencial; R. Time: tempo de retenção; Name: nome do constituinte químico.

3.2.2 Experimento 1: Determinação dos tempos de indução e recuperação sob diferentes concentrações do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico

Antes de iniciar os experimentos, foram aclimatados por cinco dias às condições do laboratório, mantidos em sistema de recirculação com uma taxa de renovação de 200% ao dia, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os parâmetros de qualidade de água das unidades experimentais foram monitorados para garantir os padrões adequados para a espécie. Diariamente foram avaliados os seguintes parâmetros físicos: temperatura ($27,0 \pm 1,83$ °C), oxigênio dissolvido ($5,90 \pm 0,25$ mg L⁻¹) e pH ($7,67 \pm 0,22$) através de um medidor multiparâmetro (YSI Pro Plus, USA), e duas vezes por semana, os parâmetros químicos: amônia NH₃ ($0,07 \pm 0,11$ mg L⁻¹), nitrito NO₂ ($0,24 \pm 0,24$ mg L⁻¹) e nitrato NO₃ ($6,63 \pm 0,0$ mg L⁻¹) através de um fotocolorímetro (Alfakit, Brasil).

Foram utilizados 100 peixes (10 por concentração), com um peso médio de $38,37 \pm 9,28$ g, distribuídos aleatoriamente em 10 caixas de poliuretano de 50 L, e submetidos a adição de nove concentrações de óleo essencial de canela (60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 e 140 µL L⁻¹) e um controle submetido apenas ao maior volume do diluente (álcool etílico 95%, P.A.) na água, utilizado na proporção 1:10.

Os peixes foram capturados individualmente com o auxílio de um puçá e inseridos em um aquário com aeração constante contendo 1 L de água e a concentração do óleo essencial a ser avaliado, ou apenas o álcool (grupo controle). Foram observados os estágios de anestesia e os tempos de indução registrados. A cada 5 peixes, a solução anestésica (água + óleo essencial) foi substituída. A avaliação foi realizada individualmente. O peixe foi considerado anestesiado quando apresentou perda total de equilíbrio e tônus muscular, baixa frequência dos movimentos operculares e respostas reflexivas fortemente atenuadas, não reagindo aos estímulos externos (Weber *et al.*, 2009).

Em seguida os animais foram rapidamente retirados, pesados e alocados em um aquário (10 L) com aeração constante, contendo somente água, onde foram observados e registrados os tempos de recuperação. O peixe foi considerado recuperado quando apresentou comportamento similar ao estado pré-anestésico. Na sequência, foram transferidos para tanques contendo aproximadamente 50 L de água e agrupados de acordo com a concentração anestésica a qual foram submetidos, onde ficaram em observação por 24 horas para avaliar a sobrevivência.

3.2.3 Experimento 2: Avaliação de parâmetros sanguíneos e histopatológicos após exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*

Antes de iniciar os experimentos, os animais foram aclimatados por sete dias às condições do laboratório, mantidos em sistema de recirculação em tanques de poliuretano (500 L) com uma taxa de renovação de 100% ao dia, com fotoperíodo natural. Diariamente foram avaliados os seguintes parâmetros físicos: temperatura ($28,0 \pm 1,63$ °C), oxigênio dissolvido ($6,90 \pm 0,30$ mg L⁻¹) e pH ($7,58 \pm 0,12$) através de um medidor multiparâmetro (YSI Pro Plus, USA), e uma vez por semana, os parâmetros químicos: amônia NH₃ ($0,05 \pm 0,10$ mg L⁻¹), nitrito NO₂ ($0,30 \pm 0,12$ mg L⁻¹) e nitrato NO₃ ($7,89 \pm 0,15$ mg L⁻¹) através de um fotolorímetro (Alfakit, Brasil). Desta forma, os 27 peixes ($86,69 \pm 30,37$ g) foram alojados em nove tanques (densidade de três peixes por tanque) e distribuídos nos seguintes tratamentos:

T0 (tempo zero) – Após a anestesia, foram imediatamente coletadas amostras de sangue, seguida pela eutanásia, pesagem e coleta de amostras de tecidos (brânquias e fígado);

T1 (tempo 1h) – Após a anestesia, os indivíduos retornaram à caixa original (contendo somente água e aeração) para recuperação. Após 1 hora, foram novamente capturados, anestesiados, coleta de sangue, seguida pela eutanásia, pesagem e coleta de amostras de tecidos; e

Tratamento Controle (sem exposição ao OEC) – Os animais rapidamente capturados, com coleta de amostras de sangue, eutanásia, pesagem e coleta de amostras de tecidos.

Os três peixes de cada tanque foram retirados ao mesmo tempo (com o auxílio de puçás), sendo um peixe direcionado para coleta de sangue (controle – sem exposição ao OEC) e os outros dois inseridos em um aquário contendo 5 L de água, sob aeração constante e OEC (100 µL L⁻¹). Após os peixes encontrarem-se anestesiados, foram retirados com auxílio de um puçá e um deles encaminhado para coleta de sangue em T0. Após a coleta, foi eutanasiado, pesado e encaminhado para realização da coleta de amostras de tecido do fígado e brânquias. O peixe destinado ao T1, retornou ao tanque inicial (contendo água e aeração constante) para recuperação por uma hora. Na sequência o animal foi novamente

capturado e anestesiado, repetiu-se o mesmo procedimento anterior para coleta de tecidos conforme relatado no T0. A cada cinco peixes a solução anestésica foi substituída.

Para as coletas de sangue foram utilizadas seringas descartáveis de 2 mL (agulhas 23G) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante. Foram coletadas aproximadamente 1,0 mL de sangue (punção do vaso caudal), imediatamente depositados em microtubos do tipo *ependorf* e armazenados em uma caixa com isolamento térmico contendo gelo reciclável.

Em todos os tratamentos, logo após a coleta de sangue e pesagem, os peixes foram eutanasiados (secção da medula espinhal caudal ao crânio) e retiradas amostras de brânquias (segundo arco branquial esquerdo) e fígado (total) para as avaliações histopatológicas. As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% (pH 6,8) (Rolls, 2012). Ao término das coletas, parte do sangue foi direcionado para obtenção do soro e enviado ao laboratório para análise de cortisol, pelo método quimioluminescência, AST e ALT, ambas pelo método cinético ultravioleta recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). O restante do sangue foi centrifugado (11600 x g durante 5 min à 4°C) para a obtenção do plasma. Este foi transferido para um novo microtubo e armazenado em nitrogênio líquido até a realização das análises de glicose e lactato (kit comercial - Labtest).

As amostras de fígado e brânquias foram encaminhadas à Universidade de Brasília para avaliação histopatológica. O material foi clivado, sendo selecionados aleatoriamente os três fragmentos de tecido em diferentes pontos de cada amostra, acondicionados em cassetes e processados rotineiramente para histopatologia. Foram realizados cortes em micrótomo rotativo na espessura de 4-5 µm e as lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE). A avaliação histopatológica foi realizada conforme metodologia empregada por Schwaiger *et al.* (1997).

3.2.4 Análise estatística

O experimento 1 foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e análise gráfica dos resíduos, e submetidos à análise de variância, teste de Scott-Knott e regressão, a 5% de significância, utilizando o software R versão 4.2.3 (R CORE TEAM, 2023). Os modelos foram ajustados com

base na significância dos parâmetros e do coeficiente de determinação. Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média.

O experimento 2 foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 9 repetições. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Foram feitas transformações Box-Cox nos casos em que essas pressuposições eram violadas. Posteriormente, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis, paramétrico e não paramétrico, respectivamente ao nível de 5% ($p < 0,05$). Quando significativo, ou seja ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelos testes de Bonferroni, quando paramétrico, e Scott-Knott, quando não paramétrico. O teste não paramétrico foi feito apenas para as situações nas quais as pressuposições da ANOVA foram violadas. Os dados foram apresentados em boxplot.

Para análise das variáveis histopatológicas foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Estes foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Bonferroni.

3.3 Resultados

3.3.1 Experimento 1: Determinação dos tempos de indução e recuperação sob diferentes concentrações do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* como anestésico

Houve efeito linear negativo entre o tempo de indução e a concentração de OEC ($R^2 = 0,85$) (Figura 3), sendo a concentração ideal de OEC $100 \mu\text{L L}^{-1}$. Quando submetidos ao maior volume utilizado de álcool etílico (95%, P.A.) sem o OEC, não ocorreu indução anestésica. O óleo essencial de canela não causou mortalidade ao longo do período de estudo.

Os peixes submetidos às concentrações de 60, 70, 80, 90 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de canela foram induzidos à anestesia em $4,42 \pm 1,15$ min; $4,47 \pm 0,92$ min; $4,70 \pm 0,86$ min; $3,78 \pm 1,12$ min respectivamente, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). As concentrações de 100, 110, 120, $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de canela induziram anestesia em $2,93 \pm 0,79$ min; $3,22 \pm 0,91$ min e $2,96 \pm 0,63$ min respectivamente, não diferiram significativamente ($p > 0,05$). As concentrações 130 e 140 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial, induziram anestesia em $2,10 \pm 0,40$ min e $2,50 \pm 0,48$ min respectivamente não apresentando

diferenças significativas ($p > 0,05$). Entretanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos citados (Figura 4A).

Em relação ao tempo de recuperação, todas as concentrações testadas tiveram o retorno ao estado pré-anestésico em um tempo inferior a 5 minutos. Os tempos de recuperações foram $3,03 \pm 0,79$ min; $3,85 \pm 0,58$ min; $3,46 \pm 0,45$ min; $3,59 \pm 0,80$ min; $3,48 \pm 0,60$ min; $3,03 \pm 0,85$ min; $3,38 \pm 0,65$ min; $2,91 \pm 0,57$ min e $3,94 \pm 0,93$ min para as concentrações de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 e 140 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de canela respectivamente. As concentrações de 60, 110 e 130 não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) e as demais concentrações também não apresentaram diferença significativa entre si. Entretanto, houve diferença entre os dois grupos citados (Figura 4B).

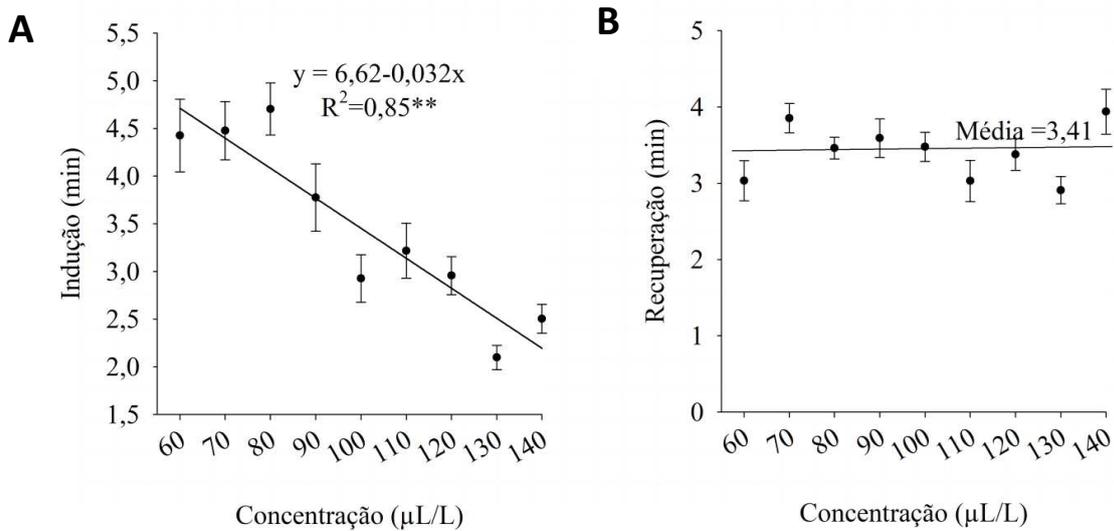


Figura 3: Tempo de indução (A) e recuperação (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição à diferentes concentrações de óleo essencial de canela (OEC).

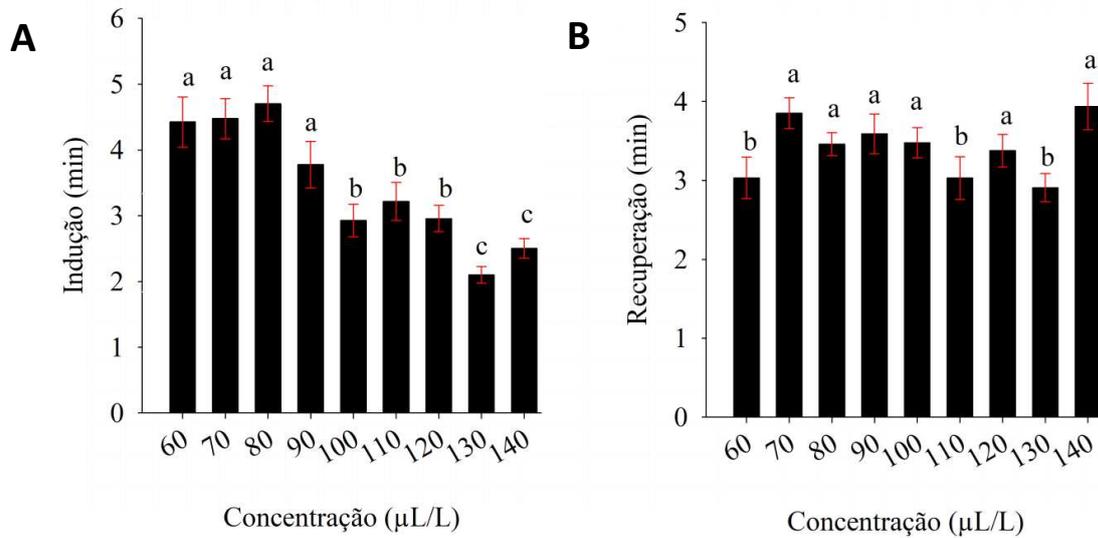


Figura 4: Tempo de indução (A) e recuperação (B) em *Oreochromis niloticus* após exposição à diferentes concentrações de óleo essencial de canela (OEC). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

3.3.2 Experimento 2: Avaliação de parâmetros sanguíneos e histopatológicos após exposição ao óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*

Menores níveis séricos de cortisol foram observados nos peixes dos grupos T0 e T1 ($4,13 \pm 1,68 \mu\text{g dL}^{-1}$ e $3,11 \pm 1,31 \mu\text{g dL}^{-1}$, respectivamente) em comparação aos peixes do grupo controle ($8,80 \pm 1,90 \mu\text{g dL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 5). Os níveis plasmáticos de glicose não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$) com valores de $47,21 \pm 5,16 \text{ mg dL}^{-1}$, $41,45 \pm 3,58 \text{ mg dL}^{-1}$ e $49,24 \pm 6,34 \text{ mg dL}^{-1}$ para os tratamentos controle, T0 e T1, respectivamente (Figura 6A). Maiores níveis de lactato foram encontrados nos espécimes do grupo T0 ($13,00 \pm 1,42 \text{ mg dL}^{-1}$) ($p < 0,05$) quando comparado aos tratamentos controle e T1 ($6,95 \pm 1,05 \text{ mg dL}^{-1}$ e $7,81 \pm 1,23 \text{ mg dL}^{-1}$) que não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) (Figura 6B).

Os peixes do tratamento T1 apresentaram níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT) superiores aos animais do grupo controle ($20,63 \pm 2,80 \text{ UI L}^{-1}$ vs $12,00 \pm 0,80 \text{ UI L}^{-1}$) ($p < 0,05$). O tratamento T0 ($15,56 \pm 2,28 \text{ UI L}^{-1}$) apresentou níveis de ALT intermediário aos tratamentos controle e T1 ($p > 0,05$) (Figura 7A). Os níveis enzimáticos do aspartato aminotransferase (AST) do grupo T1 ($51,88 \pm 10,04 \text{ UI L}^{-1}$) foram superiores em comparação aos grupos controle ($21,56 \pm 4,19 \text{ UI L}^{-1}$) e T0 ($24,56 \pm 3,97 \text{ UI L}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 7B).

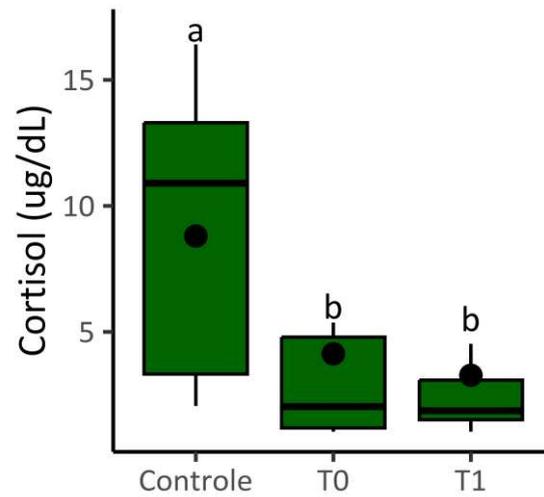


Figura 5: Níveis séricos de cortisol em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

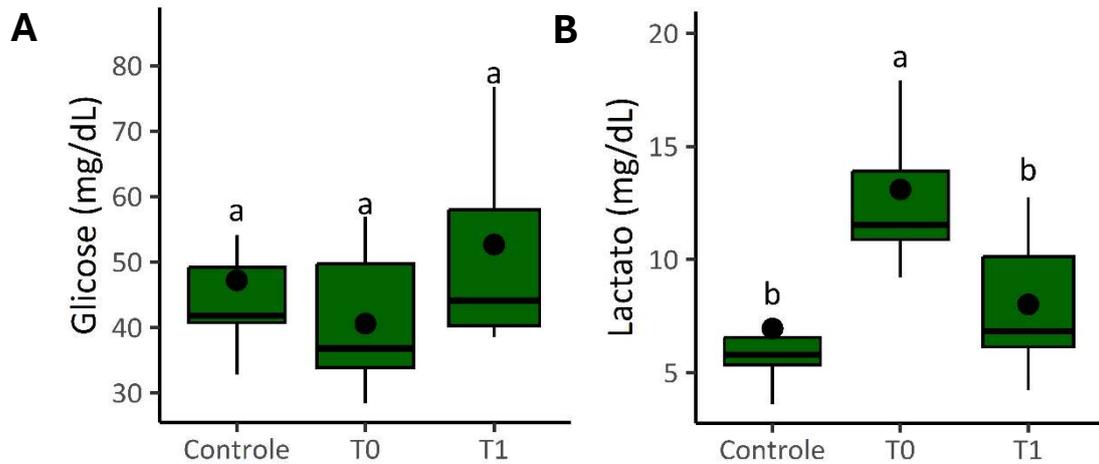


Figura 6: Níveis plasmáticos de glicose (A) e lactato (B) em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

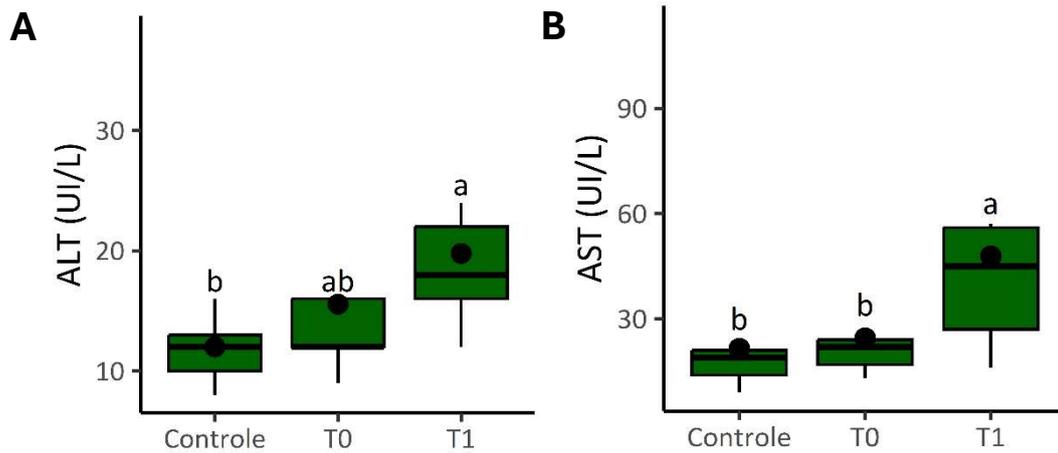


Figura 7: Níveis de alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) em *O. niloticus* após submissão ao óleo essencial de canela ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de acordo com os tratamentos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

As alterações identificadas nos tecidos (brânquias e fígado) foram classificadas com o grau de severidade e comprometimento da função branquial e hepática. Nos tecidos branquiais foi observada uma alteração significativa ($p < 0,05$) quanto a congestão (CG) nos vasos lamelares e veia central (Figura 8) quando comparado os grupos expostos ao OEC (T0 e T1) ao grupo controle, sendo menor a observação da ocorrência de lesões no grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nesse parâmetro entre T0 e T1. Ademais, não foram verificadas diferenças significativas para hiperplasia epitelial interlamelar (HEL), elevação epitelial (EE), e fusão parcial do epitélio lamelar (FPAR) ($p > 0,05$) quando comparados os tratamentos T0, T1 e controle. Não foram observados em nenhum dos tratamentos a fusão total do epitélio lamelar (Ftot) (Tabela 1).

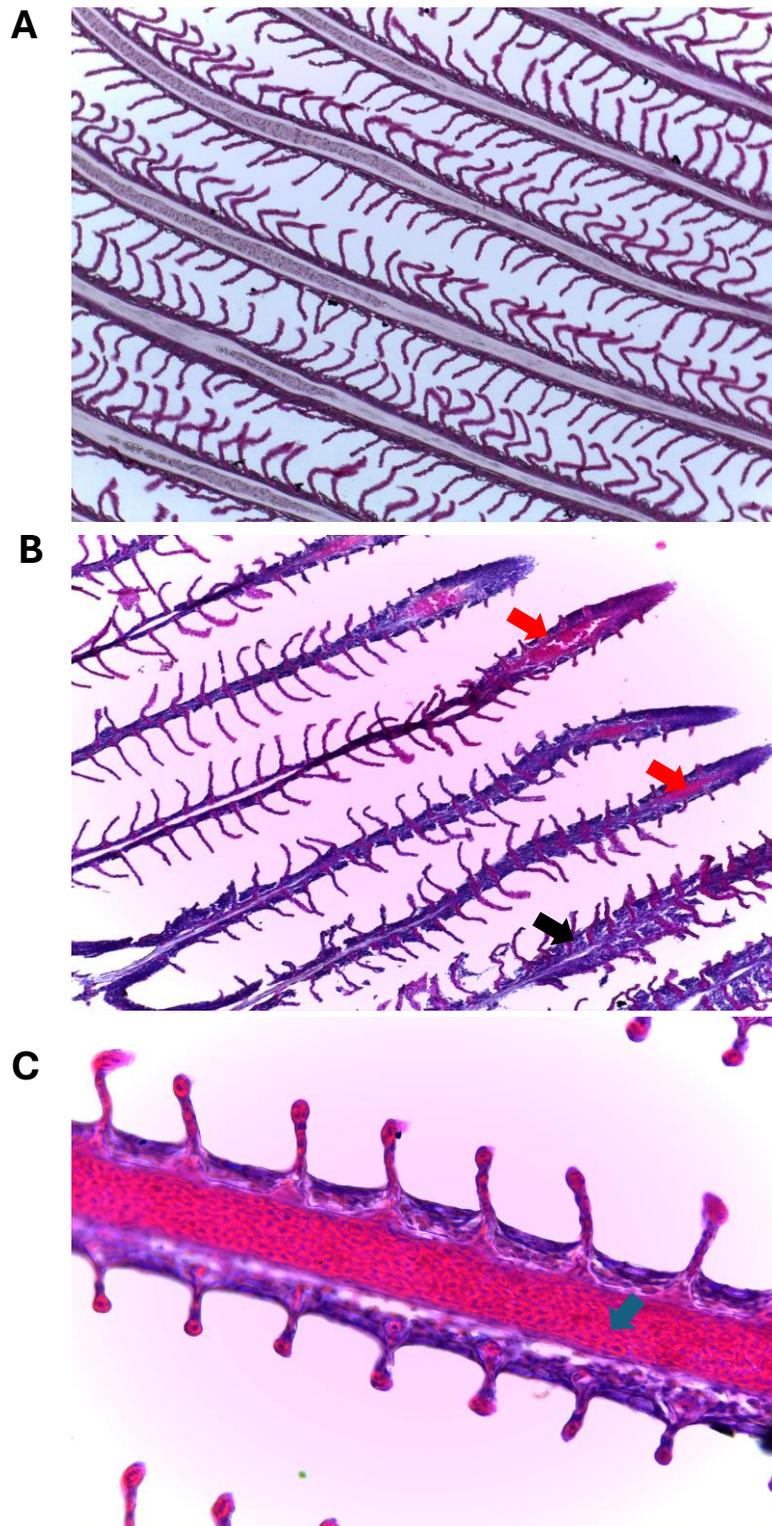


Figura 8: Fotomicrografia de secções de brânquias: tecido normal (10x) (A); presença de áreas multifocais com discreta/moderada hiperplasia do epitélio interlamelar (seta preta) e moderada congestão multifocal da veia central (setas vermelhas) (10x) (B); presença de congestão difusa acentuada da veia central (seta azul) (40x) (C).

Tabela 1: Frequência de ocorrência de alterações nas brânquias encontradas em *Oreochromis niloticus* expostos a óleo essencial de canela a $100 \mu\text{L L}^{-1}$. Controle (sem exposição a anestésico); T0 (amostrados imediatamente após a anestesia); T1 (amostrados 1 hora após anestesia inicial); N, número de animais; CG, congestionamento; HEL, hiperplasia do epitélio interlamelar; EE, elevação epitelial; Fpar, fusão parcial do epitélio lamelar. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

Tratamento	N	CG	HEL	EE	Fpar
Controle	9	$0,33 \pm 0,17^b$	$1,33 \pm 0,17^a$	$0,11 \pm 0,11^a$	$1,33 \pm 0,17^a$
T0	9	$1,56 \pm 0,18^a$	$1,44 \pm 0,18^a$	$0,11 \pm 0,11^a$	$1,56 \pm 0,18^a$
T1	9	$1,44 \pm 0,24^a$	$1,78 \pm 0,22^a$	$0,33 \pm 0,17^a$	$1,78 \pm 0,15^a$

As alterações hepáticas (Figura 9) avaliadas incluíram, congestão (identificada pela quantidade de glóbulos vermelhos nos capilares sinusoidais, veia central/centro lobular e veia/artéria portal), e degeneração (determinada pela aparência microscópica dos hepatócitos, que apresentavam citoplasma vacuolado/finamente vacuolado, núcleo central ou deslocado para a periferia, e perda da arquitetura normal do lóbulo hepático). Não foram identificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos parâmetros de congestão e degeneração quando comparamos os tratamentos T0 e T1 com o controle (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência de ocorrência de alterações hepáticas encontradas em *Oreochromis niloticus* expostos a óleo essencial de canela a $100 \mu\text{L L}^{-1}$. Controle (sem exposição ao anestésico); T0 (amostrados imediatamente após a anestesia); T1 (amostrados 1 hora após anestesia inicial); N, número de animais. Dados apresentados como média \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

Tratamento	N	Congestão	Degeneração
Controle	9	$0,67 \pm 0,17^a$	$2,22 \pm 0,43^a$
T0	9	$0,56 \pm 0,18^a$	$1,67 \pm 0,47^a$
T1	9	$0,44 \pm 0,18^a$	$1,89 \pm 0,35^a$

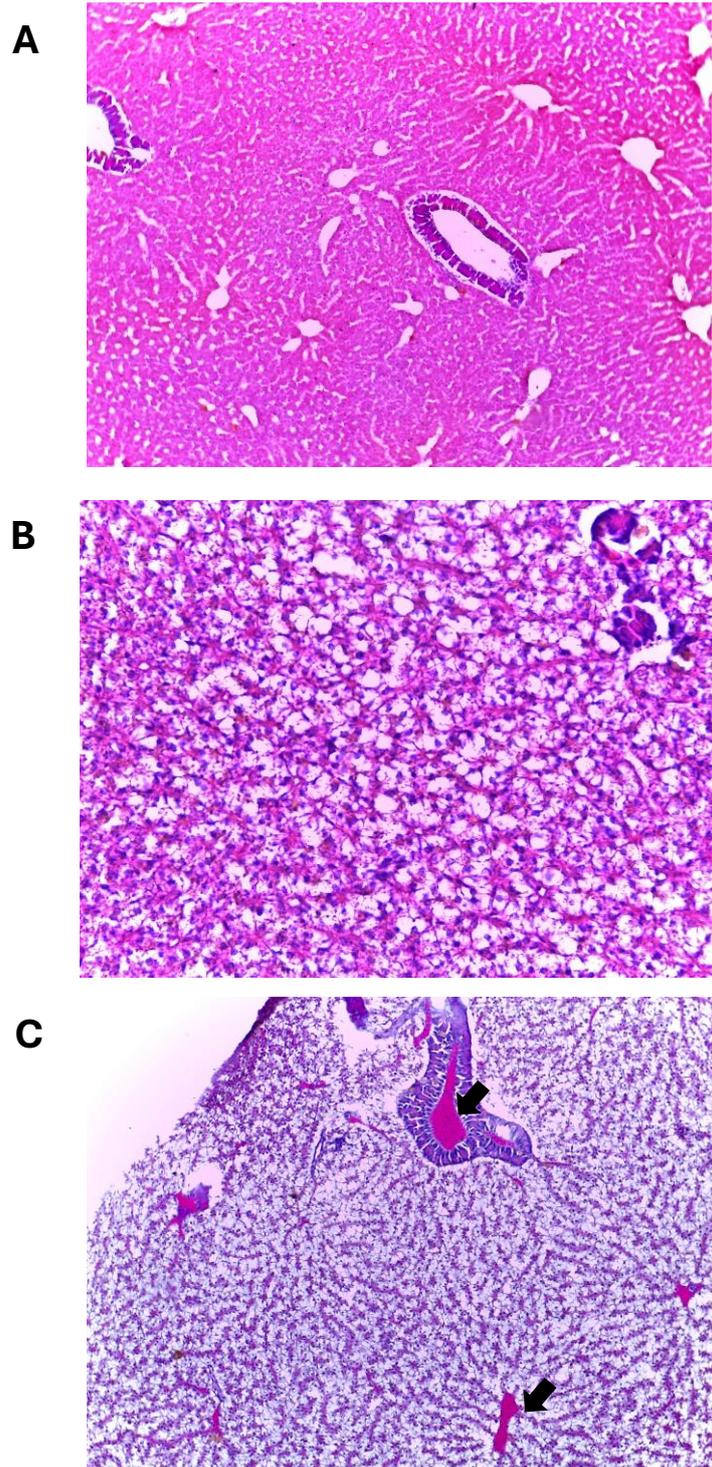


Figura 9: Fotomicrografia de secções do fígado: tecido normal (10x) (A); presença de degeneração vacuolar difusa acentuada, caracterizada por macro e microvacúolos citoplasmáticos e deslocamento do núcleo para a periferia celular (40x) (B); presença de degeneração vacuolar difusa acentuada e congestão multifocal moderada (seta preta) (10x) (C).

3.4 Discussão

Os óleos essenciais são amplamente utilizados como anestésico em *Oreochromis niloticus*, a exemplo do *Cymbopogum flexuosus* (Netto *et al.*, 2017), *Ocimum basilicum* (Netto *et al.*, 2017), *Alpinia galanga* (Surachai *et al.*, 2017), *Aloysia triphylla* (Teixeira *et al.*, 2017), *Lippia alba* (Rucinque *et al.*, 2021), *Ocimum americanum* (Rucinque *et al.*, 2021) e *Hesperozygis ringens* (Ferreira *et al.*, 2022) para facilitar manejos rotineiros no cultivo como biometrias, coleta de gametas e transporte. Neste estudo, investigou-se o potencial do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (OEC) como anestésico em *O. niloticus*.

A concentração ideal do OEC capaz de induzir anestesia em até 3 minutos e recuperação em até 5 minutos (Marking & Meyer, 1985) foi $100 \mu\text{L L}^{-1}$. Essa concentração é semelhante a observada por Ferreira *et al.* (2021) em *O. niloticus* (45,36 g), utilizando óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (90 mg L^{-1} ; indução: aproximadamente 200 s; recuperação: aproximadamente 200 s) onde o principal constituinte também é o eugenol, e por Vidal *et al.* (2008) em *O. niloticus* (5,34 g), utilizando eugenol (75 mg L^{-1} ; indução: 82,70 s; recuperação: 143,10 s), e inferior a constatada por Simões *et al.* (2012) em *O. niloticus* (55,35 g) utilizando óleo de cravo (250 mg L^{-1} ; indução: 79,5 s; recuperação 433,0 s), onde o eugenol é o constituinte principal.

O ciclo do estresse em peixes envolve a liberação rápida de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) estimulando a mobilização de glicose para fornecer energia (Reid *et al.*, 1998; Iwama *et al.*, 2004). Na sequência o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal é ativado, o que leva à liberação de cortisol (Pankhurst, 2001). Este hormônio desempenha vários papéis, incluindo a regulação do metabolismo energético e a resposta imune (Nardocci *et al.*, 2014) assim, o cortisol estimula a mobilização dos aminoácidos plasmáticos inibe a síntese e estimula o catabolismo das proteínas e sua conversão a glicose através da gliconeogênese no fígado consequentemente aumentando os níveis de glicose no sangue (Iwama *et al.*, 2004, Weber & Villar, 2018). Também podem ser utilizados como substratos energéticos o lactato e o glicerol (Mommsen *et al.*, 1999), essas respostas adaptativas ajudam os peixes a enfrentarem situações estressantes e na manutenção da homeostase (Weber & Villar, 2018).

Os níveis de cortisol observados no tratamento T0 ($4,13 \pm 1,68 \mu\text{g dL}^{-1}$) e T1 ($3,11 \pm 1,31 \mu\text{g dL}^{-1}$) foram inferiores quando comparados ao controle ($8,80 \pm 1,90 \mu\text{g dL}^{-1}$). Dessa

forma, o óleo essencial de canela utilizado como anestésico impediu o aumento dos níveis de cortisol durante a manipulação e coleta de sangue. Resultado semelhante foi observado por Simões *et al.* (2012) quando avaliou o óleo de cravo (250 mg L⁻¹) como anestésico em *O. niloticus* (47,94 g) e verificou que este foi eficiente em suprimir o aumento dos níveis de cortisol durante o manejo da anestesia. Entretanto ao contrário do visto neste trabalho, Yousefi *et al.* (2022) observou um incremento nos níveis plasmáticos de cortisol após anestesia com eugenol (30 e 80 mg L⁻¹) em *Oreochromis niloticus* (35,8 g) quando comparou ao grupo não submetido ao anestésico. Nossos resultados corroboram com os argumentos apresentados pela literatura, onde afirma-se que o uso de anestésicos promove bem-estar, reduz o estresse e inibe picos elevados de cortisol (Neifer & Stamper, 2009; Cunha *et al.*, 2010; Gneiding *et al.*, 2024).

Os valores dos níveis da glicose plasmática observados nos animais expostos ao T0 (41,45 ± 3,58 mg dL⁻¹) foram significativamente iguais aos valores do tratamento controle (47,21 ± 5,16 mg dL⁻¹) e T1 (49,24 ± 6,34 mg dL⁻¹). Resultados semelhantes foram observados por Simões *et al.* (2012) e Yousefi *et al.* (2022) ao avaliarem o óleo de cravo (250 mg L⁻¹) e eugenol (30 e 80 mg L⁻¹) em *O. niloticus*, respectivamente. Eles constataram que esses compostos não foram eficientes em evitar o aumento dos níveis de glicose durante o procedimento da anestesia. Esse aumento provavelmente seja devido a ação das catecolaminas sendo comum sua elevação após a anestesia ou eventos estressantes (Wendelar Bonga, 1997; Kristan *et al.*, 2012). Reações de elevação dos níveis de glicose decorrentes da anestesia utilizando eugenol também foram observadas em *Rhamdia quelen* (118,93 g) submetidas a 50 mg L⁻¹ (Silva *et al.*, 2023), *Ctenopharyngodon idella* (743 g) submetidas a 50 mg L⁻¹ (Gneiding *et al.*, 2024) e *Carassius auratus* (283,33 g) expostas ao eugenol (20, 30, 40, 50, 60, 70, e 80 mg L⁻¹) (Jiang *et al.*, 2023).

Os níveis de lactato em T0 (13,00 ± 1,42 mg dL⁻¹) foram superiores ao encontrado no grupo controle e T1 (6,95 ± 1,05 mg dL⁻¹ e 7,81 ± 1,23 mg dL⁻¹, respectivamente), sendo este um indicador de estresse nos animais. O aumento do lactato após anestesia também foi relatado para *O. niloticus* (35,8 g) exposto 80 mg L⁻¹ de eugenol (Yousefi *et al.*, 2022), em *Rhamdia quelen* (118,93 g) submetidas a 50 mg L⁻¹ de eugenol (Silva *et al.*, 2023) e em *Astyanax altiparanae* (8,87 g) anestesiado com óleo de cravo (50 mg L⁻¹) (Oliveira *et al.*, 2019). O aumento do nível plasmático de lactato é consequência do metabolismo anaeróbio, frequentemente percebido após a anestesia sendo associado aos efeitos da hipóxia gerada

pela bradipneia durante a anestesia ou pela excitação imediatamente anterior à anestesia (Trushenski *et al.*, 2012; Matsche, 2017).

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) desempenham papéis essenciais no metabolismo de proteínas e carboidratos, sendo sua atividade suscetível a perturbações causadas por fatores biológicos, químicos e fisiológicos, ou mesmo por alterações no ciclo de Krebs (Hagerstrand, 1975). Mudanças nas atividades dessas enzimas podem induzir alterações bioquímicas, refletindo uma tentativa do peixe em restabelecer o equilíbrio durante a exposição a substâncias tóxicas que comprometem seu desempenho bioquímico e fisiológico (Abbas & El-Badawi, 2014). Portanto, as atividades da ALT e AST são amplamente reconhecidas como biomarcadores confiáveis para avaliar danos hepáticos (Ayyat *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2022).

No presente estudo, as enzimas ALT e AST no tratamento T0 (ALT: $15,56 \pm 2,28$ UI L⁻¹; AST: $24,56 \pm 3,97$ UI L⁻¹) não apresentaram diferença em comparação ao grupo controle (não submetido ao OEC) (ALT: $12,00 \pm 0,80$ UI L⁻¹; AST: $21,56 \pm 4,19$ UI L⁻¹), logo, supõe-se que a exposição rápida ao OEC não ocasionou dano hepático. Resultado semelhante foi observado por Zahran *et al.* (2021) ao avaliar o eugenol como anestésico em *O. niloticus*, onde observaram que não ocorreu aumento significativo na concentração destas enzimas, corroborando com os resultados deste estudo em T0. Entretanto, foi percebido aumento significativo de ambas as enzimas em T1 (ALT: $20,63 \pm 2,80$ UI L⁻¹; AST: $51,88 \pm 10,04$ UI L⁻¹) quando comparado ao controle, sugerindo que a exposição repetida ao OEC tem um efeito danoso sobre o tecido hepático. Resultado semelhante foi verificado por Dong *et al.* (2022) e Jiang *et al.* (2023) onde observaram um aumento nos níveis das enzimas ALT e AST após a exposição ao eugenol em *Lateolabrax maculatus* (98,6 g; 12 mg L⁻¹) e *Carassius auratus* (283,33 g; 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 mg L⁻¹) respectivamente. Contudo, quando observado a análise estatística da avaliação histopatológica não foi constatado diferença entre os tratamentos.

As brânquias desempenham funções essenciais para os peixes, incluindo trocas gasosas, excreção de resíduos nitrogenados e ajuste osmótico (Jiao *et al.*, 2019). Além de suas funções fisiológicas, as brânquias também servem como indicadores biológicos para medir a qualidade da água, sendo um meio crucial pelo qual os peixes interagem com o ambiente aquático (Cappello *et al.*, 2016). Os tecidos branquiais são importantes vias para a administração de substâncias, dentre elas os anestésicos, utilizados em práticas de manejo e

pesquisa. A congestão nas brânquias, caracterizada pelo acúmulo excessivo de sangue nos vasos lamelares e na veia central, pode comprometer a eficácia das trocas gasosas e a excreção de resíduos, levando a um estado de hipóxia e acúmulo de substâncias tóxicas no organismo do peixe (Santos, 2010; Lima *et al.*, 2022).

O. niloticus expostos ao óleo essencial de canela apresentaram congestão nos vasos lamelares e veia central dos tecidos branquiais significativamente diferente aos animais do grupo controle. Isso corrobora com estudos realizados em *Clarias gariepinus* (150 g) expostos a eugenol (250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Abdel-Fattah *et al.*, 2005) e em *Prochilodus nigricans* (221,34 g) anestesiado com eugenol (25 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1}) (Viegas *et al.*, 2020) onde foi observado congestão dos vasos sanguíneos branquiais. Segundo Abdel-Fattah *et al.* (2005) a congestão branquial pode ser explicada pelo fato do eugenol ser absorvido e excretado predominantemente pelas brânquias e por porções de pele sem escamas e tecidos ricamente vascularizados. Entretanto, outros estudos descreveram que esse anestésico pode causar um grau leve de hiperplasia epitelial lamelar em juvenis de *Pterophyllum scalare* (0,80 g) (Oliveira *et al.*, 2019) bem como edema e elevação das lamelas branquiais em *Carassius auratus* (283,33 g) (Jiang *et al.*, 2023) e desorganização das lamelas, fusão parcial das lamelas e aneurismas em *Prochilodus nigricans* (221,34 g) (Viegas *et al.*, 2020). Contudo, no presente estudo não foram identificadas diferenças significativas para hiperplasia epitelial interlamelar, elevação epitelial e fusão parcial do epitélio lamelar entre os animais exposto ao OEC e o grupo controle. Esses resultados estão em conformidade com o fato de que o eugenol, em concentrações baixas e médias, pode ser utilizado como indutor anestésico em peixes, devido à sua rápida indução e recuperação adequada, sem causar alterações significativas nos tecidos, atentando-se ao fato de que concentrações elevadas de eugenol podem induzir insuficiência ventilatória (Abdel-Fattah *et al.*, 2005).

O fígado possui diversas funções vitais no organismo dos peixes teleósteos, atuando no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, desintoxicação, hematopoiese e produção de anticorpos (Takashima & Hibiya, 1982; Hinton & Laurén, 1990). Lesões no fígado, resultantes do acúmulo de toxinas, podem causar complicações metabólicas (Simonato *et al.*, 2008). Durante o processo de desintoxicação, o tecido hepático pode apresentar alterações morfológicas celulares dependendo do agente tóxico, dose e tempo de exposição (Bombonato *et al.*, 2007). Alterações histológicas são comumente verificadas

em estudos de toxicidade (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2023; Leao-Buchir *et al.*, 2023).

Os peixes expostos ao OEC não tiveram alterações estatisticamente significativas nos tecidos hepáticos com relação as alterações histopatológicas avaliadas (congestão e degeneração). Este resultado corrobora com estudo em *Oncorhynchus mykiss* (123 g) anestesiados com 30 mg L⁻¹ de óleo de cravo onde nenhuma alteração histopatológica foi demonstrada nos tecidos (fígado, baço, rins craniais e caudais) após anestesia (Velísek *et al.*, 2005). Em estudos com *Clarias gariepinus* (150 g) expostos a eugenol na concentração de 250 µg mL⁻¹ os animais apresentaram necrose do tecido hepático e quando submetidos a 125 µg mL⁻¹ de eugenol demonstraram degeneração vacuolar centro lobular moderada (Abdel-Fattah *et al.*, 2005). No presente estudo não houve diferenças estatísticas quando comparados os diferentes tratamentos e seus efeitos no fígado.

3.5 Conclusão

O óleo essencial de canela pode ser usado como anestésico adequado em *Oreochromis niloticus* (38,37 ± 9,28 g) na concentração de 100 µL L⁻¹, uma vez que induziu anestesia em até 3 minutos e recuperação em até 5 minutos. O OEC provocou um aumento dos níveis de lactato sérico após a exposição (T0) e não inibiu o aumento dos níveis plasmáticos de glicose, não apresentando diferenças entre tratamentos e controle. Contudo, evitou a elevação dos níveis de cortisol. Além disso, ocasionou alterações no tecido branquial (T0 e T1) e nos níveis sanguíneos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) uma hora após a anestesia (T1). Entretanto não produziu alterações histopatológicas significativas no tecido hepático. Dessa forma, o OEC pode ser considerado um anestésico seguro para uso em *O. niloticus*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou resultados promissores sobre o uso de um anestésico alternativo seguro para *O. niloticus*. O óleo essencial de canela pode ser utilizado rotineiramente na pesquisa ou comercialmente. Foi determinado a concentração ideal para a anestesia, além de fornecer informações detalhadas sobre o estresse e possíveis danos teciduais associados à sua utilização. Esses achados destacam o potencial do OEC como uma ferramenta valiosa na aquicultura e na pesquisa científica.

Aprofundar as investigações sobre o uso de óleos essenciais é fundamental, com o *Cinnamomum zeylanicum* destacando-se como um candidato promissor como anestésico para aplicação em peixes. A utilização de anestésicos em atividades rotineiras na aquicultura não apenas facilita o manejo, mas também garante a segurança dos trabalhadores e o bem-estar dos animais. Algumas direções para futuras pesquisas podem incluir a avaliação do OEC na sedação durante o transporte e em diferentes estágios do desenvolvimento de *O. niloticus*. Além disso, é essencial avaliar os possíveis efeitos tóxicos do efluente remanescente após o uso como anestésico, para assegurar a viabilidade ambiental de sua aplicação.

5 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.H.; EL-BADAWI, A.A. Use of hematological and biochemical parameters and histological changes to assess the toxicity of drumstick tree (*Moringa oleifera*) seeds extract on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**. 18, 21–40, 2014.

ABDEL-FATTAH, M.A.F.; DESSOUKI, A.A.; RAMADAN, T.; MONA M.; ISMAIL, M.M. Evaluation of eugenol as anesthetic in Cat-fish (*Clarias gariepinus*) with special reference to biochemical and histopathological alterations. **Beni-Suef University, Journal of Veterinary Medical Research**. 15, 116-122, 2005.

AGASTHYA A.S.; JAYAPAL, N.; NAVEENKUMAR. E.; GOUD, N.R.; VIJAYANAND, J.; HEMAPRIYA, J. In vitro study of antimicrobial activity of the South Indian spices against enteric pathogens. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences**. 11, 173–180, 2009.

ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2024 (PEIXE BR, 2024). Disponível em: <peixebr.com.br>. Acesso em: 30 jul 2024.

AYDIN, B.; BARBAS, L.A.L. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**. 520, 734999, 2020.

AYDIN, B.; ORHAN, N. Effects of thymol and carvacrol anesthesia on the electrocardiographic and behavioral responses of the doctor fish *Garra rufa*. **Aquaculture**. 533, 736134, 2021.

AYYATA, M.S.; AYYAT, A.M.N; AL-SAGHEERA, A.A.; EL-HAISC, A.E.M. Effect of some safe feed additives on growth performance, blood biochemistry, and bioaccumulation of aflatoxin residues of Nile tilapia fed aflatoxin-B1 contaminated diet. **Aquaculture**. 495, 27-34, 2018.

BALASCH, J.C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. **Frontiers in Endocrinology**. 10, 1-12, 2019.

BANDEIRA JUNIOR, G.; BIANCHINI, A.E.; DE FREITAS SOUZA, C.; DESCOVI, S.N.; DA SILVA FERNANDES, L.; DE LIMA SILVA, L.; CARGNELUTTI, J.F.; BALDISSEROTTO, B. The use of Cinnamon Essential Oils in aquaculture: antibacterial, anesthetic, growth-promoting, and antioxidant effects. **Fishes**. 7, 1-15, 2022.

BARATA, M.; SOARES, F.; ARAGÃO, C.; ALMEIDA, A.C.; POUSÃO-FERREIRA, P.; RIBEIRO, L. Efficiency of 2-phenoxyethanol and Clove Oil for Reducing Handling Stress in Reared Meagre, *Argyrosomus regius* (Pisces: Sciaenidae). **Journal of the World Aquaculture Society**. 47, 82-92, 2016.

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

BOMBONATO, M.T.S.; ROCHEL, S.S.; VICENTINI, C.A.; VICENTINI, I.B.F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. 29, 81-85, 2007.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**. 36, 349-356, 2006.

BSHARY, R.; GINGINS, S.; VAIL, A.L. Social cognition in fishes. **Trends in Cognitive Sciences**. 18, 465–471, 2014.

CAPPELLO, T.; BRANDÃO, F.; GUILHERME, S.; SANTOS, M.A.; MAISANO, M.; MAUCERI, A.; CANARIO, J.; PACHECO, M.; PEREIRA, P. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining 1H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. **Science of The Total Environment**. 548, 13–24, 2016.

CORREIA, A.M.; PEDRAZZANI, A.S.; MENDONÇA, R.C.; MASSUCATTO, A.; OZÓRIO, R.A.; TSUZUKI, M.Y. Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). **Brazilian Journal of Biology**. 78, 436-442, 2018.

CUNHA, M.A.; ZEPPEFELD, C.C.; GARCIA, L.O.; LORO, V.L.; FONSECA, M.B.; EMANUELLI, T.; LIMA VEECK, A.P.; COPATTI, C.E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**. 40, 2107-2114, 2010.

DAS, B.C.; RAMANAN, A.; GORAKH, S.S.; PILLAI, D. JAYADRADHAN, R.K.V. Sub-chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to environmentally relevant concentrations of smaller microplastics: Accumulation and toxico-physiological responses. **Journal of Hazardous Materials**. 458, 131916, 2023.

DONG, H.; ZENG, X.; WANG, W.; DUAN, Y.; CHEN, J.; ZHANG, J. Protection of teprenone against anesthetic stress in gills and liver of spotted seabass *Lateolabrax maculatus*. **Aquaculture**. 557, 738333, 2022.

ELLIS, T.; JAMES, J.D.; SUNDH, H.; FRIDELL, F.; SUNDELL, K.; SCOTT, A.P. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. **Aquaculture**. 272, 698–706, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. The blue transformation in action. Rome. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/cd0683e>>. Acesso em: 30 jul 2024.

FERREIRA, A.L.; FAVERO, G.C.; BOAVENTURA, T.P.; SOUZA, C.F.; FERREIRA, N.S.; DESCOVI, S.N.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; LUZ, R.K. Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753): efficacy for anesthesia and transport of *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. 47, 135–152, 2021.

FERREIRA, A.L.; SOUZA, A.S.; FAVERO, G.C.; PINHEIRO, C.G.; HEINZAMANN, B.M.; BALDISSEROTTO, B.; LUZ, R.K. Anesthetic and sedative efficacy of essential oil of *Hesperozygis ringens* and the physiological responses of *Oreochromis niloticus* after biometric handling and simulated transport. **Fish Physiology and Biochemistry**. 48, 1155-1166, 2022.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.A.; MONTEIRO, R.A.F.; REIS-HENRIQUES, M.A.; ROCHA, E. Spatial relationships of the intrahepatic vascular– biliary tracts and associated pancreatic acini of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): A serial section study by light microscopy. **Annals of Anatomy**. 189, 17-30, 2007.

GAMPERL, A.K.; VIJAYAN, M.M.; GOUTILIER, R.G. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 4, 215-255, 1994.

GAUY, A.C.S.; BOLOGNESI, M.C.B.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Longterm body tactile stimulation reduces aggression and improves productive performance in Nile tilapia groups. **Nature portfolio**. 12, 20239, 2022.

GNEIDING, B.; BONOTO, D.R.; BENDHACK, F.; MAUERWERD, M.T.; OLIVEIRA, J.E.B.; MADEIRA, H.M.F.; MACEDO, R.E.F.; PINTO, R.D.; BALDAN, A.P. The influence of eugenol, benzocaine and ice water on the welfare of adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Veterinary Research Communications**. 48, 787-796, 2024.

HAGERSTRAND, I. Distribution of alkaline phosphatase activity in healthy and diseased human liver tissue. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**. 83, 519–526, 1975.

HELDWEIN, C.G.; SILVA, L.L.; GAI, E.Z.; ROMAN, C.; PARODI, T.V.; BURGER, M.E.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E.M.M.; HEINZMANN, B.M. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Veterinary Anaesthesia**. 1-9, 2014.

HE, R.; LEI, B.; YUEPENG, S.; WANG, A.; CUI, K.; SHI, X.; CHEN, X. Effectiveness of eugenol as an anesthetic for adult spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). **Aquaculture**. 523, 735180, 2020.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**. 8, 51–66, 1990.

HOSEINI, S.M.; RAJABIESTERABADI, H.; TARKHANI, R. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. **Aquaculture Research**. 46, 405-412, 2015.

HOSEINI, S.M.; TAHERI MIRGHAED, A.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. 11, 550-564, 2018.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**. 207, 15-19, 2004.

JIAO, W.; HAN, Q.; XU, Y.; JIANG, H.; XING, H.; TENG, X. Impaired immune function and structural integrity in the gills of common carp (*Cyprinus carpio L.*) caused by chlorpyrifos exposure: Through oxidative stress and apoptosis. **Fish & Shellfish Immunology**. 86, 239–245, 2019.

JIANG, L.; HUANG, B.; TANG, J.; JIANG, P.; CHEN, D.; ZHANG, C. Comprehensive analysis of physiological, biochemical and flavor characteristics changes in Crucian Carp (*Carassius auratus*) under different concentrations. **Foods**. 12, 2820, 2023.

KRISTAN, J.; STARA, A.; TUREK, J.; POLICAR, T.; VELISEK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca L.*). **Neuroendocrinol Lett**. 33, 66-71, 2012.

LIMA, I.C.M.; COUTO, N.J.P.; SOUZA, D.S.; OLIVEIRA, I.C.S.; FARIAS, R.L.; SANTOS, D.M.S. Biomarcadores histológicos em espécies nativas de peixes na avaliação da saúde do ecossistema Lago Açu, Maranhão. In: RAMOS, J. (Eds.). **Open Science Research IX**. Guarujá: Editora Científica Digital. p. 1423-1440, 2022.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. Stress in fishes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. 30, 113-117, 2006.

LEAO-BUCHIR, J.; SOUZA, T.L.; SOUZA, C.; FÁVARO, L.F.; BRITO, P.M.; CARNEIRO, M.C.; MARCON, B.H.; ESQUIVEL, L. RIBEIRO, C.A.D.; PRODOCIMO, M.M. BDE-99 (2,2',4,4',5-pentain polybrominated diphenyl ether) induces toxic effects in *Oreochromis niloticus* after sub-chronic and oral exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 97, 104034, 2023.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell Stress**. 5, 76-85, 2021.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**. 10, 2-5, 1985.

MATSCHE, M.A. Efficacy and physiological response to chemical anesthesia in wild hickory shad during spawning season. **Marine and Coastal Fisheries**. 9, 296-304, 2017.

MAZANDARANI, M.; HOSEINI, S.M. Menthol and 1,8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**. 48, 3041- 3051, 2017.

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

NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P.P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C., FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. 40, 531-538, 2014.

NEIFER, D.L.; STAMPER, M.A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR Journal**. 50, 343–360, 2009.

NETTO, J.D.L.; OLIVEIRA, R.S.M.; COPATI, C.E. Efficiency of essential oils of *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon flexuosus* in the sedation and anaesthesia of Nile tilapia juveniles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 89, 2971-2974, 2017.

OLIVEIRA, C.P.B.; LEMOS, C.H.P.; FELIX, S.A.; DE SOUZA, S.A.; ALBINATI, A.C.L.; LIMA, A.O.; COPATTI, C.E. Use of eugenol for the anaesthesia and transportation of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**. 513, 734409, 2019.

OLIVEIRA, R.H.F.; PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; VIEGAS, E.M.M. Clove oil attenuates stress responses in lambari, *Astyanax altiparanae*. **Aquaculture Research**. 0, 1-7, 2019.

PANKHURST, N.W. Stress inhibition of reproductive endocrine processes in a natural population of the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. **Marine and Freshwater Research**. 52, 753-761, 2001.

PARANAGAMA, P.A.; WIMALASENA, S.; JAYATILAKE, G.S.; JAYAWARDENA, A.L.; SENANAYAKE, U.M.; MUBARAK, A.M. A comparison of essential oil constituents of bark, leaf root and fruit of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blum), grown in Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**. 29, 147-153, 2010.

RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; PREMAKUMARA, G.A.S.; GALAPPATHTHY, P.; CONSTANTINE, G.R.; KATULANDA, P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): A systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13, 1-10, 2013.

R CORE TEAM. R: a language and environment statistical computing. 2023.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 120, 1- 27, 1998.

ROLLS, G. **Fixation and fixatives-popular fixative solutions**. Wetzlar: Leica biosystems. 2012.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3^a ed. Oxford: Blackwell Science, 236p, 2008.

RUCINQUE, D.S.; FERREIRA, R.F.; LEME, P.R.P.; LAPA-GUIMARÃES, J.; VIEGAS, E.M.M. *Ocimum americanum* and *Lippia alba* essential oils as anaesthetics for Nile tilapia: Induction, recovery of apparent unconsciousness and sensory analysis of fillets. **Aquaculture**. 531, 735902, 2021.

SANTOS, D.M.S. **Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão**. 2010. 96f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2010.

SARAIVA, J.L.; ARECHAVALA-LOPEZ, P. Welfare of fish - no longer the elephant in the room. **Fishes**. 4, 39, 2019.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. 6, 75-86, 1997.

SELYE, H. **The Stress of Life**. New York: McGraw-Hill Book Company, 324p, 1956.

SILVA, E.; DESCHAMPS, G.T.; MATTER, F.L.; BERTOLDI, F.C.; ALDEGUNDE, M.; SILVA, D.F.; LOPES, C.; JATOBÁ, A.; WEBER, R.A. The anaesthetic efficacy of *Eucalyptus globulus* essential oil on silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Research**. 52, 5190-5197, 2021.

SILVA, E.; DESCHAMPS, G.T.; MATTER, F.L.; ALDEGUNDE, M.; SILVA, D.F.; LOPES, C.; JATOBÁ, A.; WEBER, R.A. 2-Phenoxyethanol as an anesthetic for *Rhamdia quelen*: a comparison with eugenol. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**. 18, 41-50, 2023.

SIMONATO, J.D.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicological and Environmental Safety**. 69, 112-120, 2008.

SIMÕES, L.N.; GOMIDE, A.T.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; GOMES, L.C. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. 34, 175-181, 2012.

SNEDDON, L.U.; BROWN, C. Mental capacities of fishes. *In*: JOHNSON, L.S.M.; FENTON, A.; SHRIVER, A. (Eds). **Neuroethics and Nonhuman Animals**. São Paulo: Springer. p. 53-71, 2020.

SURACHAI, P.; KHUMPIRAPANG, N.; CHAISRI, W.; SIRIPORN, O. Effects of *Alpinia galanga* oil on anesthesia and stress reduction in *Oreochromis niloticus*. **Drug Discoveries & Therapeutics**. 11, 186-192, 2017.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features**. 2 Ed. Tokyo: Kodansha Ltd, 195p, 1982.

TEIXEIRA, R.R.; SOUZA, R.C.; SENA, A.C.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B.M.; COUTO, R.D.; COPATTI, C.E. Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture Research**. 48, 3383-3392, 2017.

TRUSHENSKI, J.T.; BOWZER, J.C.; BOWKER, J.D.; SCHWARZET, M.H. Chemical and electrical approaches to sedation of hybrid striped bass: induction, recovery, and physiological responses to sedation. **Transactions of the American Fisheries Society**. 141, 455-467, 2012.

VALENTI, W.C.; BARROS, H.P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G.W.; CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**. 19, 100611, 2021.

VELÍSEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVÁ, V. Effects of Clove Oil Anaesthesia on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria BRNO**. 74, 139-146, 2005.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, R.C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43, 1069-1074, 2008.

VIEGAS, R.M.; FRANÇA, C.L.; CASTRO, J.S. CASTRO, J.J.P.; SANTANA, M.P.G.; COSTA-LIMA, M.P.G.; CARVALHO NETA, R.N.F.; CARREIRO, C.R.P.; TEIXEIRA, E.G. Eugenol as an efficient anesthetic for neotropical fish *Prochilodus nigricans* (Teleostei, Prochilodontidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 72, 1813-1820, 2020.

WEBER, R.A.; PELETEIRO, J.B.; GARCÍA MARTÍN, L.O.; ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**. 288, 147–150, 2009.

WEBER, R.A.; VILLAR, M.A. Estresse em Peixes Teleósteos – Efeito Sobre o Crescimento e a Reprodução. *In*: WEBER, R.A. (Eds). **Tópicos em aquicultura**. Curitiba: Editora CRV Ltda. p. 11-50, 2018.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. 77, 591–625, 1997.

YOUSEFI, M.; HOSEINI, S.M.; AYDIN, B.; MIRGHAED, A.T.; KULIKOV, E.V.; DRUKOVSKY, S.G.; SELEZNEV, S.B.; RUDENKO, P.A.; HOSEINIFARF, S.H.; DOAN, H.V. Anesthetic efficacy and hemato-biochemical effects of thymol on juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**. 547, 737540, 2022.

ZAHRAN, E.; RICHA, E.; RIZK, Z. Comparison propofol and eugenol anesthetics efficacy and effects on general health in Nile Tilapia. **Aquaculture**. 534, 736251, 2021.

ZHAO, W.; CUI, X.; WANG, Z.; YAO, R.; XIE, S.; GAO, B.; ZHANG, C.; NIU, J. Beneficial changes in growth performance, antioxidant capacity, immune response, hepatic health, and flesh quality of *Trachinotus ovatus* fed with *Oedocladium carolinianum*. **Frontiers in Immunology**. 13, 940929, 2022.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO - MEC
 Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense – Campus Araquari

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE, CÂMPUS ARAQUARI

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação do óleo essencial de Cinnamomum zeylanicum como anestésico para uso com o Oreochromis niloticus**” de protocolo número “**426/2023**” sob a responsabilidade de “**Robilson Antonio Weber**” que envolve a **utilização** de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de **Pesquisa** encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794 de 08 de Outubro de 2008, do Decreto 6.899 de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais IFC-Araquari em reunião de “**20/04/2023**”.

Vigência do projeto:	01/09/2023 a 30/10/2023
Espécie/Linhagem:	Peixes
Nº de Animais:	120 animais
Peso/Idade:	Não especificado
Sexo:	Não especificado
Origem:	Aquicultura comercial - Joinville

OBS:

Em caso de não execução do projeto, deve ser solicitada a retirada do mesmo em até 60 dias após a emissão do parecer conforme orientação disponível em <http://araquari.ifc.edu.br/ceua/>
 60 dias após a execução do projeto, deve ser submetido relatório final para avaliação do comitê conforme regimento do CEUA Artigo 25 §4:

§ 4º. O proponente de um projeto/protocolo deve, ao final da execução do mesmo, encaminhar à CEUA/IFC o relatório final contendo informações básicas baseando-se nos itens descritos no formulário de submissão. O não envio de relatórios de projetos/protocolos já concluídos implicará na não aprovação de novos projetos/protocolos do mesmo proponente.

Juliano Santos Gueretz
 Prof. EBTT (Siape nº1810731)
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais do IFC - Campus Araquari
 Portaria nº 1565/2021/Reitoria



Emitido em 26/04/2023

CERTIFICADO Nº 335/2023 - MEDVET/ARA (11.01.02.02.01.22)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/04/2023 07:53)

JULIANO SANTOS GUERETZ

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

MEDVET/ARA (11.01.02.02.01.22)

Matrícula: ###107#1

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **335**, ano: **2023**, tipo: **CERTIFICADO**, data de emissão: **26/04/2023** e o código de verificação: **29ccb63875**