

**Diogo Bessa Neves Spanghero**

**BUTIRATO DE SÓDIO COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO E  
ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ-PIMENTA COMO  
ANESTÉSICO DE *Rhamdia quelen***

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Aquicultura.

Orientador: Evoy Zaniboni-Filho  
Coorientadora: Janaína dos Santos Pedron

Florianópolis  
2018

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC**

Spanghero, Diogo Bessa Neves

Butirato de sódio como suplemento dietético e óleo essencial de hortelã-pimenta como anestésico de *Rhamdia quelen* / Diogo Bessa Neves Spanghero ; orientador, Evoy Zaniboni-Filho, coorientador, Janaína dos Santos Pedron, 2018.

93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Ácidos orgânicos. 3. extrato vegetal. 4. concentração letal. 5. histologia. I. Zaniboni-Filho, Evoy. II. Pedron, Janaína dos Santos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Butirato de sódio como suplemento dietético e óleo essencial de hortelã-pimenta como anestésico de *Rhamdia quelen***

Por

DIOGO BESSA NEVES SPANGHERO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTOR EM AQUICULTURA**

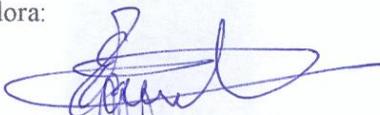
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof.a. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



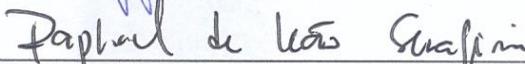
---

Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Orientador*



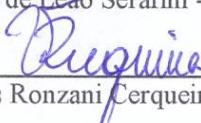
---

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC



---

Dr. Raphael de Leão Serafini - EPAGRI



---

Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira - UFSC



A minha família que tornou este sonho possível, em especial a minha esposa Emília e filha Aimê, que estiveram presentes em todos os momentos.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares que me fazem todos os dias acreditar que eu posso mais e mais, em especial a minha mãe que sempre se esforçou e me apoiou para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

A minha esposa Emília e minha filha Aimê, que sempre me acompanharam em todas as minhas “empreitadas” da vida e nelas estiveram sempre ao meu lado e foram meu porto seguro em tudo; por todo apoio, incentivo e amor.

Aos meus amigos da pós-graduação, foram várias alegrias, sempre juntos.

Ao meu orientador Evoy Zaniboni Filho, pela confiança e presteza, contribuindo diretamente com o meu crescimento ao longo desta etapa. Este trabalho é fruto de tudo isso. Agradeço ainda, por todos os ensinamentos, conversas e pela força para que cada parte desse trabalho se concretizasse.

A todos os funcionários, técnicos, alunos e professores do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), em especial a Renata, Janaína, Cristian, Maurício, Josiane, Samara, Luciano e Vinícius.

Aos colegas do LABNUTRI, em especial ao meu amigo Bruno Pierri pela amizade.

Ao professor José Luiz P. Mouriño pelas sugestões e amizade, sempre muito atencioso e com ideias brilhantes.

Ao professor Maurício Laterça e a Eng<sup>a</sup>. de Pesca Edsandra Chagas pelo apoio e confiança.

Aos colegas do laboratório AQUOS, em especial a Gabriel e Lucas, sempre muito prestativos e atenciosos.

A Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores do programa de Pós-graduação em aquicultura e em especial ao querido Carlito, sempre muito atencioso.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e aos meus amigos e colegas que conquistei ao longo desta jornada e que me receberam muitíssimo bem em Florianópolis, o meu **MUITO OBRIGADO!**



*"Toda modificação para melhor reclama luta,  
tanto quanto qualquer ascensão exige esforço..."*

Emmanuel



## RESUMO

A presente tese explorou as potenciais atividades biológicas da *M. piperita* e do butirato de sódio sobre a espécie de peixe *Rhamdia quelen*, com o objetivo de desenvolver tecnologias para induzir um rápido crescimento das larvas desta espécie, como também, produzir peixes mais resistentes ao parasito *Ichthyophthirius multifiliis*, através do fornecimento de dietas enriquecidas com esses aditivos alimentares. Também foi avaliada a toxicidade e o efeito anestésico do óleo essencial de hortelã-pimenta sobre juvenis de *R. quelen*. Num primeiro estudo, foi determinada a concentração letal de *M. piperita* em 4 h de exposição ( $CL_{50-4h}$ ), testando seis concentrações (0, 20, 50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup>). Após o período de exposição foram analisadas as brânquias dos peixes submetidos a cada concentração. O potencial anestésico foi avaliado em quatro concentrações (50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup>). O período de exposição de quatro horas provocou lesões branquiais como: congestão do seio venoso da lamela primária e na base da lamela secundária; hiperplasia interlamelar e com fusão das lamelas; descolamento do epitélio; dilatação do seio venoso; edema justalamelar e aneurisma. O óleo de *M. piperita* demonstrou ser um eficiente anestésico para juvenis de *R. quelen* na concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, com reduzido tempo de anestesia (<4 min) e de recuperação (<10 min), sem mortalidade. Essa concentração é segura apenas para curtos períodos, pois a partir de 4 h de exposição, torna o produto tóxico à espécie e ultrapassa a  $CL_{50-4h}$  (75 mg L<sup>-1</sup>). O segundo estudo avaliou os efeitos potenciais da suplementação dietética do óleo essencial (OE) de *M. piperita* e do butirato de sódio (BS), sendo cinco dietas utilizadas: 0% (controle) dieta isenta da inclusão de aditivo; OE1% e OE2%, inclusão de 1% ou 2% de óleo essencial de *M. piperita* por quilo de ração, respectivamente; BS0,25% e BS0,50%, inclusão de 0,25% ou 0,50% de butirato de sódio por quilo de ração, respectivamente. Essa dieta foi fornecida para a alimentação de larvas de *R. quelen* durante 30 dias. Após este período foi avaliado o desenvolvimento zootécnico, a mucosa intestinal, a resistência ao estresse e a infestação contra o parasito *Ichthyophthirius multifiliis*. As diferentes dietas testadas não afetaram a resistência dos peixes ao estresse pela exposição ao ar e à água salinizada. Da mesma forma, a suplementação dietética não foi capaz de inibir a infestação por *I. multifiliis* no tegumento dos peixes. Os peixes suplementados com 0,50% de butirato de sódio (BS0,50%) em suas dietas apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros zootécnicos analisados ( $p < 0,05$ ). Quando comparado à dieta controle, a suplementação de

BS0,50% aumentou tanto a largura dos vilos quanto a quantidade de células caliciformes presentes na mucosa intestinal, ambas em aproximadamente 50%. Essas descobertas podem ter importantes implicações na produção de larvas de *R. quelen* e devem ser levadas adiante com novos estudos.

**Palavras-chave:** Aquicultura, ácidos orgânicos, extrato vegetal, concentração letal, histologia.

## ABSTRACT

Due to the already known use of peppermint *Mentha piperita* essential oil as medicament and organic acids, such as sodium butyrate, which provide better performance, as well as its numerous beneficial effects on the digestive and immune system in fish, the present thesis explored the potential biological activities of *M. piperita* and sodium butyrate on the species of fish *Rhamdia quelen*, with the aim of developing technologies to induce a rapid growth of larvae of this species, as well as to produce fish more resistant to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*, by providing diets enriched with such food additives. The toxicity and anesthetic effect of peppermint essential oil on *R. quelen* juveniles were also evaluated. In a first study, the lethal concentration of *M. piperita* in 4 h of exposure ( $LC_{50-4\text{ h}}$ ) was determined by testing six concentrations (0, 20, 50, 80, 110 and 140 mg L<sup>-1</sup>). After the exposure period, the gills of the fish submitted to each concentration were analyzed. The anesthetic potential was evaluated in four concentrations (50, 80, 110 and 140 mg L<sup>-1</sup>). The exposure period of four hours resulted in branchial lesions such as: congestion of the primary lamella venous sinus and at the base of the secondary lamella; interlamellar and lamellar hyperplasia; epithelial detachment; dilation of the venous sinus; edema and aneurysm. *M. piperita* oil proved to be an efficient anesthetic for juveniles of *R. quelen* at 80 mg L<sup>-1</sup>, with a short time of anesthesia (<4 min) and recovery (<10 min), without mortality. This concentration is safe only for short periods, since after 4 h exposure the product turns toxic to the species and exceeds the  $LC_{50-4\text{ h}}$  (75 mg L<sup>-1</sup>). The second study evaluated the potential effects of dietary supplementation of essential oil (EO) of *M. piperita* and sodium butyrate (BS), with five diets used: 0% (control) diet free of additive inclusion; OE1% and OE2%, inclusion of 1% or 2% of essential oil of *M. piperita* per kilogram of feed, respectively; BS0.25% and BS0.50%, inclusion of 0.25% or 0.50% sodium butyrate per kilogram of feed, respectively. This diet was fed to *R. quelen* larvae for 30 days. After this period, zootechnical development, intestinal mucosa, resistance to stress and infestation against the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* were evaluated. The different diets tested did not affect fish resistance to stress due to exposure to air and saline water. Likewise, dietary supplementation was not able to inhibit *I. multifiliis* infestation in fish integument. Fish supplemented with 0.50% sodium butyrate (BS0.50%) in their diets presented better performance in all zootechnical parameters analyzed ( $p < 0.05$ ). When compared to the control diet, supplementation

of BS0.50% increased both the villi width and the amount of goblet cells present in the intestinal mucosa, both by approximately 50%. These findings may have important implications for the production of *R. quelen* larvae and should be carried forward with further studies.

**Keywords:** Aquaculture, organic acids, plant extract, lethal concentration, histology.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Exemplar do Jundiá (*R. quelen*) ..... 23

Figura 2 - Ilustração do cruzamento entre as espécies *Mentha spicata* e *Mentha aquatica* para produção da *Mentha piperita*..... 25

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Representação da taxa de mortalidade de juvenis de *Rhamdia quelen* expostos por quatro horas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Mentha piperita* (n=30)..... 52

Figura 2 - Fotomicrografia das principais lesões apresentadas nas brânquias de *Rhamdia quelen* expostas por quatro horas à água de cultivo com adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Mentha piperita*. A: expostos à água de cultivo (controle), com a presença de hiperplasia da lamela secundária; B: exposição à 20 mg L<sup>-1</sup> - congestão do seio venoso da lamela primária; C: exposição à 50 mg L<sup>-1</sup> - hiperplasia interlamelar (1) e com fusão das lamelas secundárias (2); D: exposição à 80 mg L<sup>-1</sup> - congestão na base da lamela secundária (1) e descolamento do epitélio da lamela secundária (2); E: exposição à 110 mg L<sup>-1</sup> - dilatação do seio venoso; F: exposição à 140 mg L<sup>-1</sup>—aneurisma (1) e edema justalamelar (2)..... 53



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Atributos dos principais sedativos disponíveis no mercado. 29

### CAPÍTULO I

Tabela 1 - Valor médio do grau de lesão branquial observado em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* (n=9) expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* por um período de quatro horas. .... 50

Tabela 2 - Tempo (em segundos) de indução aos diferentes estágios de anestesia e de recuperação dos juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* (n=9) expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita*. Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão ..... 51

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* ..... 59

Tabela 2 - Valores de sobrevivência (%) acumulada até às 24 h (média  $\pm$  desvio padrão) de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* alimentadas por 30 dias com diferentes dietas e submetidas à exposição ao ar (60 min) e à água salinizada (20 g L<sup>-1</sup>) por 30 minutos. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio ..... 63

Tabela 3 - Desempenho zootécnico de larvas de *Rhamdia quelen* (média  $\pm$  DP) alimentadas por 30 dias com diferentes dietas. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio ..... 63

Tabela 4 - Histomorfologia do intestino das larvas de jundiá *Rhamdia quelen* alimentadas com diferentes dietas. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BF – Biomassa final  
BS – Butirato de sódio  
CCAC – Canadian Council on Animal Care  
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais  
CL<sub>50</sub> – Concentração letal para 50% da população  
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
EE – Extrato etéreo  
Embrapa – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária  
FDA – Food and Drugs Administration  
GABA<sub>A</sub> – Ácido gama-aminobutírico tipo A  
HE – Hematoxilina-eosina  
INAD – Investigational New Animal Drug  
IR – Índice de retenção  
LABNUTRI – Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas  
LAPAD – Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce  
MPA – Ministério da pesca e aquicultura  
MS-222 – Tricaína metano sulfonato  
NH<sub>3</sub> – Amônia não ionizada  
NO<sub>2</sub>- – Nitrito  
NTP – National Toxicology Program  
OE – Óleo essencial  
OMS – Organização mundial de saúde  
PB – Proteína bruta  
S – Sobrevivência  
SNC – Sistema Nervoso Central  
t – Traço  
EU – Unidade experimental  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UFR – Use of Fishes in Research  
USA – United State of America  
USPHS – U.S. Public Health Service



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Mentha piperita</i> .....	24
1.1.1	Toxicidade do <i>Mentha piperita</i> .....	26
1.1.1.1	Efeito anestésico do <i>Mentha piperita</i> .....	27
1.1.2	BUTIRATO DE SÓDIO .....	31
1.1.3	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	32
1.2	OBJETIVOS .....	34
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	34
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	35
<b>2</b>	<b>FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS</b> .....	36
	CAPÍTULO I.....	37
	Resumo.....	37
	Introdução .....	38
	Material e métodos .....	39
	Resultados e discussão .....	43
	Conclusões .....	46
	Agradecimentos.....	46
	Referências .....	46
	Tabelas .....	50
	Figuras .....	52
	CAPÍTULO II .....	55
	Resumo .....	55
	Introdução .....	56
	Material e métodos .....	58
	Resultados .....	62
	Discussão.....	65
	Conclusões .....	67
	Agradecimentos.....	68
	Referências.....	68
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	75
	REFERÊNCIAS .....	77



## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de peixes que apresentam um grande potencial para a aquicultura nacional, encontram-se as do gênero *Rhamdia*. Destas, podemos destacar o *Rhamdia quelen* (figura 1), regionalmente conhecido como jundiá. É um peixe de água doce que apresenta ampla distribuição na América do Sul (PERDICES *et al.*, 2002), está dentre as espécies registradas ao longo da Bacia do Rio Uruguai (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003).

Seu potencial para a aquicultura é devido ao seu grande porte, podendo atingir meio metro de comprimento padrão (ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2004), apresentar comportamento dócil em cativeiro e aparentemente um baixo nível de estresse aos principais manejos de cultivo (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003).

Figura 1: Exemplar do Jundiá (*R. quelen*).



Fonte: LAPAD

Outras características deste peixe vêm despertando grande interesse na região, entre elas: o alto valor comercial, ótima qualidade da carne, considerado produto nobre por apresentar carne saborosa com baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares (MARCHIORO e BALDISSEROTTO, 1999; BARCELLOS *et al.*, 2001), o que faz da carne do jundiá um produto com grandes possibilidades de exportação. Além disso, exemplares selvagens apresentam ótima adaptação ao cativeiro, com a utilização de dietas artificiais e com crescimento satisfatório mesmo em temperaturas baixas (CARNEIRO *et al.*, 2002; FRACALLOSSI *et al.*, 2004).

Apesar deste potencial, muitos produtores brasileiros têm optado pela criação de outras espécies, tornando sua produção no Brasil no ano de 2016 ainda menor que 0,6% da produção nacional (IBGE, 2017). Mesmo com a existência de uma ampla gama de estudos visando o desenvolvimento tecnológico do cultivo de jundiá, pode-se apontar

como o principal motivo para esta pequena produção, através da aquicultura, a falta de tecnologias produtivas específicas, com destaque para o canibalismo na fase de larvicultura, a maturação precoce e o crescimento heterogêneo durante a fase de engorda (FRACALOSSI *et al.*, 2002).

Provavelmente a falta de dados concretos sobre o manejo produtivo é o motivo central do desinteresse de muitos produtores, tornando necessários programas efetivos de desenvolvimento de pacotes tecnológicos voltados para esta espécie. Uma forma de melhorar o desempenho zootécnico pode ser a partir da suplementação de sua dieta com ácidos orgânicos ou óleos essenciais, já que alguns estudos têm demonstrado que tanto os ácidos orgânicos (HOSSAIN *et al.*, 2007; DEFOIRDT *et al.*, 2009), como os óleos essenciais (GABRIEL *et al.*, 2015; ADEL *et al.*; 2015; ANDRADE *et al.*, 2016) são alternativas preventivas na manutenção da saúde de peixes cultivados, por atuar no trato intestinal inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente as Gram-negativas, auxiliando na digestibilidade e absorção de nutrientes, além de exercerem efeitos sobre o desempenho zootécnico dos animais.

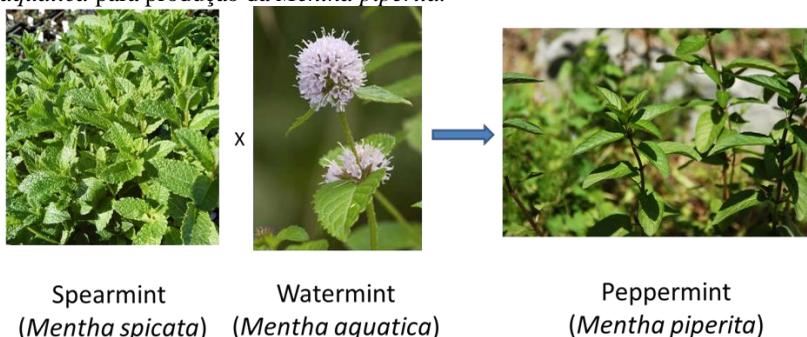
### 1.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita*

Dos alimentos à base de plantas utilizados como medicamentos, nenhum recebeu mais atenção do que as espécies de menta, que são exploradas pelo homem há mais de dois mil anos (DUBICK, 1986). Entre outras plantas, as da espécie *Mentha* sp. há tempos confirmaram ter efeitos antimicrobianos (MAHBOUBI e HAGHI, 2008), antioxidantes (MIMICA-DUKIC *et al.*, 2003), de redução do colesterol (HARDARI *et al.*, 2010), além de efeitos significativos sobre o sangue e os parâmetros de imunidade (NOBAKHT e MEHMANNVAZ, 2010), antifúngicos (HADIAN *et al.*, 2008), anti-úlceras, atividade anti-inflamatória (BLUMENTHAL, 1998), de redução dos triglicerídeos (AKDOĞAN *et al.*, 2007), atividade anti-mutagênica (YU *et al.*, 2004), estimulantes, carminativas e antiespasmódicas, além de propriedades antidoto para venenos (BHATTACHARJEE, 1998).

Dentre as espécies de *Mentha* sp. podemos destacar a *Mentha piperita* (também conhecida como Peppermint), que é uma erva perene pertencente à família Lamiaceae. É uma planta híbrida resultante do cruzamento entre Spearmint (*Mentha spicata*) e Watermint (*Mentha aquatica*) (ISCAN *et al.*, 2002) (figura 2), sendo um dos medicamentos mais antigos do mundo, muito usada tanto pela cultura oriental quanto

ocidental (KEIFER *et al.*, 2007). Seu óleo essencial, também, é utilizado na medicina tradicional. Entre os seus usos, sua aplicação tópica pode reduzir artrite, reumatismo e dores nas articulações devido aos seus efeitos analgésicos. Além disso, os vapores quando inalados são muito úteis em alguns distúrbios respiratórios como, por exemplo, alguns casos de congestionamentos nasais, sinusites, laringites e bronquites (RAKOVER *et al.*, 2008). Os usos tradicionais e suas propriedades antioxidantes, antitumorais, antialérgicas, antivirais, como também, suas atividades fungicidas, inseticidas e antibacterianas foram estudadas (MCKAY e BLUMBERG, 2006; YADEGARINIA *et al.*, 2006; TUNG *et al.*, 2008).

Figura 2: Ilustração do cruzamento entre as espécies *Mentha spicata* e *Mentha aquatica* para produção da *Mentha piperita*.



Fonte: norfolkherbs; pfaf.org; pt.wikipedia.org (respectivamente)

Relacionando a utilização deste óleo essencial com a aquicultura, alguns autores encontraram resultados bastante promissores. ADEL *et al.* (2015) observaram que a adição do OE de *M. piperita* à dieta, promoveu um maior crescimento e melhor conversão alimentar, além de melhorar os principais parâmetros hematológicos e imunológicos para a espécie *Rutilus frisii kutum* e inibir o crescimento das bactérias *Streptococcinae*, *Yersiniaruckeri*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Quando fornecido ao *Lates calcarifer* também houve melhoras no seu desempenho zootécnico, além de ser observado um aumento significativo dos eritrócitos, leucócitos, hematócrito e da hemoglobina. Aumentou a atividade fagocítica e bactericida, melhorando sua imunidade contra a infecção por *Vibrio harveyi*, além de reduzir os lipídios, triglicerídeos e níveis de colesterol (TALPUR, 2014). Outros autores observaram atividade anti-helmíntica do OE de

*M. piperita* contra *Dawestrema* spp. (MALHEIROS *et al.*, 2016), com diminuição em até 70% da prevalência em tilápia do Nilo parasitada por monogêneos *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* (HASHIMOTO *et al.*, 2016) e efeito citotóxico contra *I. multifiliis* (VALLADÃO *et al.*, 2016).

Apesar destes resultados, para combater as principais patologias em espécies aquáticas, em geral, são utilizados os antibióticos (SUBASINGHE, 2009). No entanto, o uso contínuo dessas drogas pode resultar em efeitos adversos, tais como: resistência à droga, imunossupressão, contaminação ambiental e riscos para a saúde humana (DEFOIRDT *et al.*, 2011), além de seus resíduos serem importantes ameaças à saúde pública (DEFOIRDT *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a resistência ao antibiótico como um grande e crescente problema para a saúde pública em uma escala global, tanto na medicina humana quanto veterinária, tornando seu uso restrito.

Esse fato estimula a procura de novos medicamentos e produtos à base de plantas que mostrem uma promissora estratégia de tratamento e resistência aos patógenos de peixes, incluindo parasitas (REVERTER *et al.*, 2014; BOIJINK *et al.*, 2015; BULFON *et al.*, 2015; HASHIMOTO *et al.*, 2016), já que, estudos demonstraram que as plantas, além dos benefícios citados anteriormente, têm propriedades parasiticidas em peixes (CLAUDIANO *et al.*, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016).

### 1.1.1 Toxicidade do *Mentha piperita*

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde. Através dos testes de toxicidade é possível determinar o tempo de exposição e os níveis em que o agente tóxico é potencialmente prejudicial. Esses testes são utilizados para classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (VALADARES, 2006). Independente da toxicidade do agente presente na água, o contato com o peixe pode não produzir um efeito negativo quando a concentração é muito baixa ou o tempo de contato é insuficiente. A concentração e o tempo de exposição estão diretamente relacionados ao efeito tóxico, uma vez que altas concentrações poderão ter efeitos letais em tempos curtos de exposição, enquanto que baixas

concentrações podem produzir efeitos crônicos sub-letais, ou até mesmo letais, durante longos períodos de exposição (CÉSAR *et al.*, 1997).

Uma forma de avaliar o efeito tóxico de um produto consiste em utilizar como estimativa de mortalidade o valor de  $CL_{50}$ , que é a concentração letal responsável pela morte de 50% dos peixes (CONAMA, 2011). O teste de  $CL_{50}$  foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos. Entretanto, na década de 1970, este teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsável pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas nos Estados Unidos (GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005). O valor da  $CL_{50 - 4h}$  de *M. piperita* em peixes foi estabelecida, apenas, para o pirarucu *Arapaima gigas* ( $38 \text{ mg L}^{-1}$ ) (MALHEIROS *et al.*, 2016).

A resposta ao estresse é um mecanismo integrado no qual tanto a reação quanto as consequências são exercidas em todos os níveis (genético, molecular, celular, fisiológico e comportamental) em um organismo. Dentre as várias ferramentas comumente utilizadas para determinar o estado de saúde e a condição física dos peixes, as alterações histopatológicas têm sido bastante usadas para tal fim, uma vez que expressam condições induzidas por patógenos, nutrição inadequada, qualidade da água imprópria ou inadequados cuidados de criação (TORT *et al.*, 2014).

As brânquias estão entre as estruturas mais delicadas do corpo dos teleósteos. É um órgão muito sensível quando exposto a fatores traumáticos (SARAIVA *et al.*, 2015). Sua localização externa ao corpo as tornam, ainda mais sensíveis aos agentes estressores, estando sujeitas a danos por qualquer material irritante dissolvido ou suspenso em água. Como é um órgão susceptível a lesões imediatas e os reflexos traumáticos podem ser observados diretamente nelas (ROBERTS, 2012), a avaliação histopatológica da presença de alterações na estrutura branquial pode ser uma ferramenta valiosa para determinar o efeito de potenciais produtos sobre o estado de saúde dos peixes.

#### 1.1.1.1. Efeito anestésico do *Mentha piperita*

A anestesia é uma condição biológica com perda parcial ou completa de sensibilidade, capacidade de resposta e perda de controle

neuromotor induzido por meios químicos ou não (SUMMERFELT *et al.*, 1990). Há considerável debate científico sobre se os peixes são capazes de sentir dor ou apenas exibem nocicepção (ROSE, 2002, 2003; CHANDROO *et al.*, 2004; SNEDDON, 2006). Independentemente de os peixes perceberem a dor da mesma maneira como os vertebrados superiores, no que diz respeito à investigação pesqueira, diretrizes recomendam que “os pesquisadores devem considerar que os procedimentos que causam dor ou angústia em seres humanos podem causar dor ou angústia em outros animais” (USPHS 1986; CCAC 2005), “Contenção estressante prolongada sem sedação adequada ou anestesia deve ser evitada” (UFR 2004), e “procedimentos com animais que podem causar mais do que momentânea ou ligeira dor ou angústia deve ser realizada com sedação apropriada, analgesia ou anestesia” (USPHS 1986).

De qualquer forma, os peixes sentem menos dor e se tornam mais calmos durante a anestesia, assim, a anestesia é um meio útil para manuseio, transporte e cirurgia de peixes (SUMMERFELT *et al.*, 1990; KEENE *et al.*, 1998; HOSEINI *et al.*, 2015; MAZANDARANI *et al.*, 2017). Neste sentido, o acesso a sedativos de peixe seguros e eficazes é uma necessidade imediata. Um sedativo de peixe deve ser de fácil administração, seguro de usar e eficaz em doses baixas; proporcionar sedação rápida e previsível; oferecer alguma analgesia; oferecer um estado de sedação facilmente administrável; ter uma razoável margem de segurança em relação à superdosagem; permitir uma rápida recuperação de sedação e respostas fisiológicas ao sedativo; e ser baixo custo (TRUSHENSKI *et al.*, 2013). De acordo com os critérios para seleção de um agente anestésico eficaz, é recomendado que a anestesia seja induzida rapidamente (até 3 min) e que promova uma recuperação rápida (até 10 min) após a transferência dos peixes para água livre do produto anestésico (PARK *et al.*, 2003). No entanto, o tempo de indução anestésica de 1 min ou menos foi sugerido para amostragem de sangue, tempo esse que proporcione baixo nível de estresse ao peixe (HOSEINI *et al.*, 2011; HOSEINI e GHELICHPOUR 2012; HOSEINI e NODEH 2013), e tempo de recuperação longo foi recomendado para a realização de cirurgia em peixes (ROUBACH *et al.*, 2005).

Além disso, muitas vezes é desejável que o sedativo não tenha período de retirada, o que significa que o peixe sedado pode ser imediatamente libertado na natureza ou levado para o mercado na recuperação (tipicamente referido como “retirada zero” ou “lançamento imediato”). Infelizmente, existem poucos sedativos para peixes que possuem todas essas qualidades (TRUSHENSKI *et al.*, 2013).

Atualmente, existem poucas opções de sedativos seguros, eficazes e práticos de usar disponíveis para peixes (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos dos principais sedativos para peixes disponíveis no mercado

Sedativo	Aprovado?	Limitação
Benzocaína	Não, mas pode ser usado sob autorização do INAD <sup>a</sup>	3 dias de período de retirada
CO <sub>2</sub>	Não, o FDA <sup>b</sup> não regulamenta	Agressivo e nem todos os peixes respondem bem
Eugenol	Não, mas pode ser usado sob autorização do INAD <sup>a</sup>	3 dias de período de retirada
MS-222	Sim, para imobilização temporária	21 dias de período de retirada

(Fonte: TRUSHENSKI *et al.*, 2013)

<sup>a</sup>Investigational New Animal Drug.

<sup>b</sup>U.S. Food and Drug Administration.

Os anestésicos sintéticos mais utilizados mundialmente são a tricaína metano sulfonato (MS-222) e a benzocaína, mas ambos podem causar efeitos adversos aos peixes como perda de muco, irritação das brânquias e danos à córnea (INOUE *et al.*, 2003). A benzocaína pode induzir a formação da metahemoglobinemia, uma condição que interfere na capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue e o MS-222, apesar de ser eficaz, tem seu uso limitado por algumas agências reguladoras, como a Food and Drug Administration (FDA-EUA), que impede o consumo direto de peixes tratados, exigindo depuração pelo período de 21 dias (TRUSHENSKI *et al.*, 2013).

Embora esses agentes sejam eficazes na anestesia de peixes, uma crescente atenção tem sido dada ao uso de produtos à base de plantas na anestesia de peixes, devido a uma ampla gama de efeitos adicionais, incluindo o fato de poder ser antioxidante, antimicrobiano, aliviar o estresse e promover a eficiência imunológica (Z AHL *et al.*, 2010; HOSEINI, 2011; ZEPPENFELD *et al.*, 2014; SALBEGO *et al.*, 2015). Por outro lado, os óleos ou extratos vegetais contêm vários componentes com quantidade variável e nem todos são anestésicos (HOSEINI *et al.*, 2018). Como também, a composição dos óleos e extratos de ervas pode

mudar dependendo da área geográfica, tempo de colheita, técnica de processamento e idade da planta (BADI *et al.*, 2004; JAMSHIDI *et al.* 2009; TONDOLO *et al.*, 2013).

Conhecer os efeitos anestésicos dos compostos e sua interação pode ajudar a criar novos produtos anestésicos com maior eficiência e segurança. Até porque alguns compostos de óleos essenciais têm efeitos colaterais adversos, além de relação sinérgica ou antagonista (BENOVIT *et al.*, 2015) semelhante ao relatado em anestésicos de peixes (SCHOETTGER e STEUCKE, 1970). Portanto, a aplicação de ingredientes ativos puros deve ser padronizada para o uso em anestesia de peixes, possibilitando que estes componentes sejam disponíveis comercialmente e possam ser usados com alguma vantagem em comparação aos óleos ou extratos puros (HOSEINI *et al.*, 2018).

Dentre os anestésicos naturais, o eugenol (princípio ativo do óleo de cravo) é o mais utilizado no mundo, aprovado para uso em peixes em diversos países, tais como Austrália, Nova Zelândia e Chile (TRUSHENSKI *et al.*, 2013). Apesar disso, o Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine, dos Estados Unidos, não recomenda o uso de óleo de cravo ou qualquer um de seus componentes em peixes (FDA/CVM, 2007), motivado pela existência de estudos que apresentam evidências de carcinogenicidade em ratos tratados com eugenol (NTP, 1983). Neste sentido, vários trabalhos têm avaliado a utilização de anestésicos alternativos para peixes. Estudos mais recentes mostraram sucesso na utilização de outros produtos naturais com propriedades anestésicas, incluindo óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Hesperozygis ringens*, *Lippia sidoides*, e *Ocotea acutifolia* para o jundiá *Rhamdia quelen* (SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013) e *Mentha piperita* para a tilápia *Oreochromis niloticus* (HASHIMOTO *et al.*, 2016), pirarucu *Arapaima gigas* (MALHEIROS *et al.*, 2016) e o esturjão persa (*Acipenser persicus*) (MAZANDARANI e HOSEINI, 2018)

O mentol é o principal composto do óleo essencial de *M. piperita*, apresentando concentração variável nos distintos trabalhos realizados, sendo 27,5% (HASHIMOTO *et al.*, 2016), 30,8% (MALHEIROS *et al.*, (2016) e 50% (MAZANDARANI e HOSEINI, 2018). O efeito depressor do óleo essencial de *M. piperita* é resultado da ação do mentol sobre o ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>), considerado um neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) (ZHANG *et al.*, 2008). A estimulação do GABA<sub>A</sub> por fármacos agonistas promove a hiper-polarização da membrana celular, causando depressão do SNC e a consequente anestesia (GUÉNETTE *et al.*, 2007).

### 1.1.2 BUTIRATO DE SÓDIO

A utilização dos ácidos orgânicos é uma alternativa preventiva na manutenção da saúde de peixes cultivados, por atuar no trato intestinal inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente as Gram-negativas, auxiliando na digestibilidade e absorção de nutrientes, além de exercerem efeitos sobre o desempenho zootécnico dos animais (HOSSAIN *et al.*, 2007; DEFOIRDT *et al.*, 2009). Eles contribuem com o crescimento e desempenho de animais aquáticos através de vários mecanismos, como a inibição de agentes patogênicos, melhora na absorção de macro e micronutrientes, fornecimento de uma fonte de energia disponível, além de afetar a ação das enzimas digestivas (LÜCKSTÄDT, 2008). Adicionalmente, podem alterar a disponibilidade e a absorção de certos nutrientes, tais como fósforo, lipídios e aminoácidos (MORKEN *et al.*, 2011; SARKER *et al.*, 2012a, b). Os mais utilizados são os ácidos fórmico, acético, propiônico, láctico, sórbico, málico, cítrico e butírico (LÜCKSTÄDT, 2008; NG e KOH, 2016; HOSEINIFAR *et al.*, 2016a). Estes ácidos orgânicos estão sendo cada vez mais estudados como aditivos alimentares para várias espécies de peixes e crustáceos (NG e KOH, 2016; HOSEINIFAR *et al.*, 2016a).

Dentre esses, o ácido orgânico butirato de sódio recebeu especial atenção por seus múltiplos efeitos benéficos nos tecidos periféricos do trato intestinal. Um grande número de estudos tem favorecido a compreensão dos seus efeitos no intestino de humanos e de outros animais (ROBLES *et al.*, 2013). O butirato de sódio atua melhorando a inflamação da mucosa e o estado oxidativo, reforçando a barreira de defesa epitelial, modulando a sensibilidade e a motilidade visceral (CANANI *et al.*, 2011), e além de fornecer energia aos colonócitos (BERGMAN, 1990), tem um papel regulador no transporte de fluidos transepiteliais, promovendo a absorção de sódio e água (BOND e LEVITT, 1976). Quando usado como aditivo alimentar, o butirato de sódio também influencia no ganho de peso corporal, na composição da microflora intestinal, bem como promove efeitos no epitélio intestinal, através do aumento no comprimento das vilosidades (KOTUNIA *et al.*, 2004).

Estudos sobre o uso do butirato de sódio em humanos e animais terrestres teve prominência nos últimos anos. Na saúde intestinal do cólon humano, o butirato foi mencionado como um agente anti-inflamatório. Também pode inibir a carcinogênese do cólon e o estresse oxidativo, como também aumentar a barreira de defesa do intestino (HAMER *et al.*, 2008). Em porcos e frangos de corte, a suplementação

com butirato de sódio proporcionou o aumento de peso, da resposta imune e da saúde intestinal (GALFI & BOKORI, 1990; ADIL *et al.*, 2010, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstraram melhores desempenhos dos animais quando foi utilizado esse sal como aditivo dietético para crustáceos (NUEZ-ORTIN 2011; SILVA *et al.*, 2013a; SILVA *et al.*, 2016).

Com relação aos peixes, alguns autores sugerem melhorias significativas no crescimento e nas taxas de conversão alimentar quando o butirato é incluído em dietas de algumas espécies, tais como o bagre-africano *Clarias gariepinus* (OWEN *et al.*, 2006); o pargo *Sparus aurata* (ROBLES *et al.*, 2013); a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e carpa comum *Cyprinus carpio* (ZHENG, 2009). No entanto, estudos similares não mostraram resultados positivos quanto utilizados para salmonídeos (BJERKENG *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2011). Além disso, a utilização do butirato de sódio como alternativa aos antibióticos é alvo de crescente interesse nos estudos realizados na área de aquicultura (LÜCKSTÄDT, 2006). O butirato, que também é produzido pela microbiota intestinal de peixe (KIHARA e SAKATA, 1997, 2001), foi responsável por fornecer ação defensiva contra bactérias patogênicas (NUEZ-ORTIN, 2011, 2012).

A determinação dos efeitos dos ácidos orgânicos na dieta para peixes de cultivo pode ser particularmente importante, uma vez que apesar de já existir propaganda dos benefícios dessas substâncias como aditivos eficazes em suas dietas comerciais, de acordo com NG e KOH (2016), essa informação muitas vezes é feita sem testes prévios e está baseada em resultados obtidos pela pecuária terrestre. Essa publicidade pode ser enganosa, considerando que a eficácia dos ácidos orgânicos nos animais aquáticos ser largamente dependente do tipo da substância e da espécie (NG KOH, 2016; HOSEINIFAR *et al.*, 2016a).

### 1.1.3 *Ichthyophthirius multifiliis*

A aquicultura expandiu-se nos últimos 20 anos e a tendência de aumentar a produção é esperada porque os peixes são uma importante fonte de proteína em todo o mundo (NAYLOR *et al.*, 2009). A intensificação da produção pode resultar em má qualidade da água, por conta das altas densidades de estocagem utilizadas nesses sistemas (SHOEMAKER *et al.*, 2012), podendo resultar em condições estressantes aos animais, imunossupressão, surtos de doenças e perdas econômicas (CARNEIRO *et al.*, 2007).

Entre os parasitos frequentemente associados aos peixes de água doce está o *Ichthyophthirius multifiliis* (ictio), um protozoário cosmopolita responsável pela maior parcela de parasitose em cultivos, conhecida como "doença dos pontos brancos" ou ictiofitiríase (VALLADÃO *et al.*, 2016). É a espécie mais importante dentre os Ciliophora que acomete o jundiá (*Rhamdia quelen*), sendo uma espécie que apresenta baixa especificidade de hospedeiros e ampla distribuição geográfica (TANCREDO, 2015). Episódios foram relatados em várias espécies de peixes de água doce em todo o mundo, sendo responsável por causar grandes perdas em peixes selvagens, cultivados e até mesmo aqueles utilizados como ornamentais (PAPERNA, 1972; VENTURA & PAPERNA, 1985; TRAXLER *et al.*, 1998).

Este parasita dá origem a morbidade (OSMAN *et al.*, 2009) e causa significativa perda econômica para a produção (BUCHMANN *et al.*, 2001). O ictio tem três estágios de desenvolvimento durante o ciclo de vida: um tomonte reprodutor, um teronte infeccioso e um trofonte parasita (HINES & SPIRA, 1973; NIGRELLI *et al.*, 1976). Os efeitos deletérios de *I. multifiliis* são principalmente causados pela forma parasitária trofonte, que se alimenta e se desenvolve em tecido cutâneo e nas brânquias (LING *et al.*, 2010). Além disso, este microrganismo favorece a ocorrência de infecções bacterianas (XU *et al.*, 2012a; XU *et al.*, 2012b).

Existem duas estratégias principais que são utilizadas para tratar peixes infestados com *I. multifiliis*: tratamento químico com banhos terapêuticos e tratamento via oral com adição do produto na alimentação. O tratamento com banho atua afetando a natação dos tomontes e terontes, sendo necessária a repetição do tratamento para prevenir novas infestações e matar os terontes e trofontes. No entanto, esses tratamentos químicos podem debilitar e estressar os peixes, além de aumentar a suscetibilidade dos animais tratados a infecções bacterianas e parasitárias, sem mencionar que sua aplicação pode ter efeito nocivo sobre o meio ambiente (ABDEL-HAFEZ *et al.*, 2014b).

Alguns dos principais produtos cuja eficiência é comprovada no tratamento da ictiofitiríase são: verde malaquita (SRIVASTAVA *et al.*, 2004), formalina, sulfato de cobre (FARMER *et al.*, 2013) e permanganato de potássio (RINTAMÄKI-KINNUNEN *et al.*, 2005). Por causa dos indesejáveis efeitos sobre o meio ambiente (RICO & VAN DEN BRINK, 2014), em animais e humanos (SAPKOTA *et al.*, 2008), o uso dessas substâncias foi desencorajado e até mesmo proibido em vários países, como é o caso do verde malaquita e da formalina.

Já o tratamento feito via alimentação, com ração medicamentosa, apresenta algumas vantagens por não afetar os parâmetros ambientais da água, ser fácil de administrar e menos estressante para os peixes, além de apresentar um período de atividade mais longo sobre o animal tratado. Além disso, o *I. multifiliis* já foi encontrado ocupando a cavidade peritoneal dos peixes (MAKI *et al.*, 2001), onde o tratamento por meio de banho não é eficaz. No entanto, tratamentos orais também apresentam desvantagens, pois a eficácia depende também da atividade do peixe para a ingestão da dieta, fator que é influenciado pela aceitação da dieta mesmo depois da inclusão do medicamento ao alimento (ABDEL-HAFEZ *et al.*, 2014b).

Outras opções aos tratamentos químicos também estão sendo estudadas. Vários extratos de plantas medicinais foram testados contra *I. multifiliis* *in vitro* e/ou *in vivo* e apresentarem resultados promissores, tais como: *Macleaya cordata* (YAO *et al.*, 2010), *Mucuna pruriens* e *Carica papaya* (EKANEM *et al.*, 2004), *Psoralea corylifolia* (LING *et al.*, 2013) e *Mentha piperita* (VALLADÃO *et al.*, 2016).

Apesar do uso generalizado de *M. piperita* em medicamentos tradicionais e dos ácidos orgânicos como promotores de melhoria no desempenho dos animais, assim como seus inúmeros efeitos benéficos sobre o sistema digestório e imune em várias espécies, os potenciais benefícios dessas substâncias ainda não foi avaliado no jundiá *Rhamdia quelen*, espécie de peixe com potencial para a aquicultura na região sul da América do Sul. Neste contexto, este trabalho busca avaliar o efeito do uso de dietas enriquecidas com esses aditivos alimentares na larvicultura do jundiá, buscando desenvolver tecnologias para induzir um rápido crescimento das larvas desta espécie, assim como, avaliar o efeito dessa suplementação alimentar na resistência dos peixes à infestação destes pelo parasito *Ichthyophthirius multifiliis*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade e o efeito anestésico do óleo essencial de Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen*, além da potencial utilização deste óleo e do butirato de sódio como aditivo dietético durante a larvicultura sobre o desenvolvimento zootécnico, a morfologia da mucosa intestinal, a resistência ao estresse e infestação pelo parasito *Ichthyophthirius multifiliis*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração letal do óleo essencial de *M. piperita* para 50% da população ( $CL_{50-4h}$ ) de juvenis de *R. quelen*, assim como o efeito da exposição dos peixes a esse óleo sobre o tecido branquial.
- Determinar a concentração ideal de *M. piperita* para anestésiar juvenis de jundiá *R. quelen*.
- Avaliar o efeito da inclusão de diferentes concentrações de butirato de sódio ou de óleo essencial de *M. piperita* como suplemento alimentar na larvicultura do jundiá (*R. quelen*), comparando os parâmetros zootécnicos obtidos e a resistência ao parasito *I. multifiliis*.
- Analisar o efeito da adição de diferentes concentrações de butirato de sódio ou de óleo essencial de *M. piperita*, suplementado na dieta fornecida aos peixes, sobre a morfologia do trato intestinal das larvas de jundiá (*R. quelen*).
- Avaliar o efeito da inclusão de diferentes concentrações de suplementação dietética com butirato de sódio ou com o óleo essencial de *M. piperita*, na resistência ao ar e a exposição a água salinizada das larvas de jundiá (*R. quelen*) alimentadas com essas dietas.

## **2 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS**

A tese está dividida em dois capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo. No primeiro capítulo, o artigo está formatado e submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB), qualis B1. No segundo capítulo, o artigo está formatado de acordo com as normas da revista Boletim do Instituto de Pesca (BIP), qualis B1.

## CAPÍTULO 1

### **Toxicidade e potencial anestésico do óleo essencial de *Mentha piperita* em juvenis de *Rhamdia quelen***

Diogo Bessa Neves Spanghero<sup>(1,2)</sup>, Emília Carolina Alencar de Medeiros Spanghero<sup>(2)</sup>, Janaína dos Santos Pedron<sup>(2)</sup>, Edsandra Campos Chagas<sup>(3)</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>(3)</sup> e Evoy Zaniboni-Filho<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Alagoas, Laboratório de Inovação em Aquicultura, Av. Beira Rio, CEP 57200-00, Penedo, AL, Brasil. E-mail: diogospanghero@penedo.ufal.br <sup>(2)</sup>Universidade Federal de Santa Catarina. Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Rodovia Francisco Thomaz dos Santos, n° 3532, CEP 88066-260, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: emiliaspanghero@hotmail.com, janainapedron@gmail.com, evoy@lapad.ufsc.br <sup>(3)</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM 10, km 29, CEP 69010-970 Manaus, AM, Brasil. E-mail: edsandra.chagas@embrapa.br, celio.chaves@embrapa.br.

Resumo - O objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade e o potencial anestésico do óleo essencial de *Mentha piperita* em juvenis de *Rhamdia quelen*. Para determinar a concentração letal em quatro horas ( $CL_{50-4h}$ ), 210 peixes ( $3,08 \pm 0,8$  g;  $7,59 \pm 0,67$  cm) foram expostos a 0, 20, 50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup>. O potencial anestésico foi avaliado em quatro concentrações (50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup>). O período de exposição de quatro horas provocou lesões branquiais como: congestão do seio venoso da lamela primária e na base da lamela secundária; hiperplasia interlamelar e com fusão das lamelas; descolamento do epitélio; dilatação do seio venoso; edema justalamelar e aneurisma. O óleo de *M. piperita* demonstrou ser um eficiente anestésico para juvenis de *R. quelen* na concentração de 80 mg L<sup>-1</sup>, com reduzido tempo de anestesia (<4 min) e de recuperação (<10 min), sem mortalidade. Apesar disso, a exposição prolongada por quatro horas ao óleo, nessa concentração, torna o produto tóxico à espécie e ultrapassa a  $CL_{50-4h}$  (75 mg L<sup>-1</sup>).

Termos para indexação: brânquias, histologia, concentração letal, peppermint, anestesia.

## **Toxicity and anesthetic potential of *Mentha piperita* essential oil for juveniles of *Rhamdia quelen***

Abstract - The aim of this work was to evaluate the toxicity and anesthetic potential of *Mentha piperita* essential oil in juveniles of *Rhamdia quelen*. To determine the lethal concentration at four hours ( $CL_{50-4h}$ ), 210 fish ( $3.08 \pm 0.8$  g,  $7.59 \pm 0.67$  cm) were exposed to 0, 20, 50, 80, 110 and 140 mg L<sup>-1</sup>. The anesthetic potential was evaluated at four concentrations (50, 80, 110 and 140 mg L<sup>-1</sup>). The exposure period of four hours resulted in gill injuries such as: congestion of the primary lamella venous sinus and at the base of the secondary lamella; interlamellar hyperplasia and with lamellar fusion; epithelial detachment; dilation of the venous sinus; edema and aneurysm. *M. piperita* oil demonstrated to be an effective anesthetic for *R. quelen* juveniles at 80 mg L<sup>-1</sup>, with a short time of anesthesia (<4 min) and recovery (<10 min), without mortality. However, the four-hour exposure to the oil at this concentration makes the product toxic to the species and exceeds the  $LC_{50-4h}$  (75 mg L<sup>-1</sup>).

Index terms: gills, histology, lethal concentration, peppermint, anesthesia.

### **Introdução**

Os anestésicos sintéticos mais utilizados mundialmente são a triclaína metano sulfonato (MS-222) e a benzocaína, porém ambos podem causar efeitos adversos aos peixes. A benzocaína pode induzir a formação da metahemoglobinemia, uma condição que interfere na capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue e o MS-222, apesar de ser eficaz, tem seu uso limitado por algumas agências reguladoras, como a Food and Drug Administration (FDA-EUA), que impede o consumo direto de peixes tratados, exigindo depuração pelo período de 21 dias (Trushenski et al., 2013).

Dos anestésicos naturais, o eugenol (princípio ativo do óleo de cravo) é o mais utilizado no mundo, aprovado para uso em peixes em diversos países como Austrália, Nova Zelândia e Chile (Trushenski et al., 2013). Apesar disso, o Food and Drug Administration's Center for Veterinary Medicine não recomenda o uso de óleo de cravo ou qualquer um de seus componentes em peixes (FDA/CVM, 2007), motivado pela existência de estudos que indicam que o uso do eugenol apresentou evidência de carcinogenicidade em ratos (NTP, 1983). Neste sentido,

vários trabalhos têm avaliado a utilização de anestésicos alternativos para peixes. Estudos mais recentes mostraram sucesso na utilização de outros produtos naturais com propriedades anestésicas, incluindo óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Hesperozygis ringens*, *Lippia sidoides*, e *Ocotea acutifolia* para o jundiá *Rhamdia quelen* (Silva et al., 2012; Silva et al., 2013) e *Mentha piperita* para a tilápia *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al., 2016) e pirarucu *Arapaima gigas* (Malheiros et al., 2016). Esse último, obtido de uma planta híbrida conhecida como Peppermint, é resultante do cruzamento entre Spearmint (*Mentha spicata*) e Watermint (*Mentha aquatica*) (Iskan et al., 2002).

O potencial anestésico dessa planta híbrida tem sido atribuído ao seu principal componente, o mentol, anestésico que tem revelado grande interesse para a aquicultura (Pádua et al., 2010). Porém, qualquer substância dissolvida ou suspensa em água pode ser irritante aos peixes e seus reflexos podem ser observados diretamente nas brânquias, já que sua localização externa a torna mais sensível aos agentes estressores, sendo um órgão susceptível a lesões imediatas (Roberts, 2012). Dessa forma, a avaliação da presença de alterações na estrutura branquial pode ser uma ferramenta valiosa para determinar o efeito de potenciais anestésicos sobre o estado de saúde dos peixes.

Dentre as espécies de peixes que apresentam um grande potencial para a aquicultura continental no sul do Brasil, podemos destacar o jundiá (*R. quelen*), principal espécie nativa produzida nesta região (Baldisserotto, 2009). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade e o potencial efeito anestésico do óleo essencial de *M. piperita* em juvenis de jundiá.

## **Material e métodos**

Este trabalho foi realizado em agosto de 2017 no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce da Universidade Federal de Santa Catarina. As larvas de *R. quelen* foram obtidas a partir da reprodução induzida de reprodutores selvagens originários do Alto rio Uruguai. Logo após a abertura da boca, as larvas foram alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. durante 15 dias. Após este período, foram distribuídas em caixas de fibra de vidro com capacidade de 1000 L, mantidas em condições laboratoriais com renovação contínua de água, alimentação balanceada (45% PB), aeração constante e temperatura média de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  por 60 dias, até atingirem  $3,08 \pm 0,8$  g (média  $\pm$  desvio padrão) e  $7,59 \pm 0,67$  cm de comprimento total, quando foram iniciados os experimentos de toxicidade e anestesia.

## Óleo essencial de *Mentha piperita*

O óleo essencial (OE) de *M. piperita* foi obtido no Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). As partes aéreas (folhas e/ou inflorescências) da planta foram removidas para extração do OE pelo processo de hidrodestilação. A análise química do OE foi realizada por meio de cromatografia gasosa com espectrometria de massa, seguindo procedimento descrito por Moraes et al. (2012). Seus principais componentes foram: mentol (27,5%), mentofurano (22,5%), pulegona (12,8%), acetato de mentila (12,5 %), mentona (11%), limoneno (3,5%) e 1,8-cineol (2,1%).

A natureza hidrofóbica do OE exigiu que fosse elaborada uma solução estoque diluída em álcool etílico 99,8%, utilizando a proporção de 1:9 (OE:álcool, v:v), para facilitar a sua diluição em água.

### **Toxicidade do óleo essencial de *M. piperita* (CL<sub>50</sub> - 4h) em juvenis de *R. quelen***

Para o teste de toxicidade aguda, foram utilizados 210 juvenis de *R. quelen* distribuídos em 21 unidades experimentais contendo 1 L de água e mantidos em um sistema estático, com aeração constante. Os peixes foram submetidos a jejum de 24 h antes do início do experimento e mantidos sem alimentação durante a realização do teste.

Cada tratamento consistiu em três repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram utilizados dois controles: um apenas contendo água de cultivo (água) e outro contendo água de cultivo adicionada a álcool etílico (água + 1,26 mL álcool L<sup>-1</sup>). Essa quantidade de álcool equivale à máxima quantidade utilizada no tratamento contendo a maior concentração do OE. Cinco tratamentos foram utilizados contendo concentrações crescentes (20, 50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup>) do OE na água de cultivo. Ao final do período de 4 h de exposição ao OE, foi registrada a mortalidade dos peixes e determinada a concentração letal no período (CL<sub>50-4h</sub>). Os peixes foram considerados mortos quando não apresentaram movimentos operculares e caudais, nem responderam ao estímulo do toque depois de uma hora de terem sido transferidos para a água de cultivo sem adição de OE.

## **Efeito anestésico do óleo essencial de *M. piperita***

Os ensaios de anestesia e recuperação anestésica foram realizados em unidades experimentais (3 L) contendo 1 L de água, mantidas em estado estático e aeração constante. Foram testadas quatro concentrações de *M. piperita*: 50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup> em juvenis de *R. quelen*. Nove peixes foram expostos individualmente em cada concentração após jejum de 24 h.

Os estágios de anestesia e de recuperação foram monitorados e o tempo em que os distintos peixes atingiram cada um dos estágios foi registrado em segundos, com auxílio de cronômetro digital. As características desses estágios foram modificadas da proposta de Park et al. (2009), de acordo com o comportamento dos peixes. Os estágios de anestesia foram determinados como: agitação (A1), natação lenta (A2), perda do equilíbrio (A3), repouso (A4) e paralização do batimento opercular (anestesia profunda) (A5). Ao atingirem o último estágio de anestesia, os peixes foram imediatamente retirados do recipiente contendo o OE e transferidos para recuperação em recipientes contendo água sem o OE. Para a recuperação os estágios foram: retorno do movimento opercular (R1), início do movimento (R2), início da natação (R3) e recuperação (R4). O tempo necessário para atingir cada estágio de recuperação foi igualmente registrado.

## **Qualidade de água**

Os parâmetros de qualidade da água foram mensurados com uma sonda multiparâmetro YSI 556 MPS® no início de cada experimento. A temperatura (°C), salinidade (g L<sup>-1</sup>), oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>), pH e condutividade (μS cm<sup>-1</sup>) no teste de toxicidade aguda foram de 26,2 ± 0,5; 2,0 ± 0,0; 7,6 ± 0,7; 8,0 ± 0,1; 417,0 ± 3,6 e nos ensaios de efeito anestésico foram de 26,7 ± 0,3; 2,0 ± 0,0; 7,0 ± 0,3; 7,8 ± 0,3; 393,0 ± 2,8, respectivamente.

## **Análise histológica**

Foi amostrado o segundo arco branquial do lado direito (três peixes de cada repetição) para auxiliar na avaliação dos efeitos da toxicidade aguda, imediatamente após a realização do teste. O material coletado foi identificado, fixado em solução de formalina tamponada 10% por 24 h, lavado em álcool 70% (3 × 15 min) e armazenado em álcool 70% até o processamento para análise histológica.

Os arcos branquiais foram descalcificados e desidratados em uma série ascendente de soluções alcoólicas (70, 80, 90 e 100%), processados em parafina seguindo técnicas de rotina para cortes transversais de 3 µm de espessura, usando um micrótomo manual Leica RM 2245, e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE). As imagens foram capturadas usando um microscópio de luz Zeiss AxioVert.A1 com uma câmera acoplada (AxioCam ERc5s), e analisadas com o auxílio de software de análise de imagem Zen Lite 2012.

As análises das brânquias consistiram na busca por alterações teciduais como hiperplasia da lamela secundária, interlamelar e com fusão das lamelas secundárias; descolamento do epitélio da lamela secundária; edema justalamelar; dilatação do seio venoso; aneurisma e congestão na base da lamela secundária e do seio venoso da lamela primária. Essas alterações foram classificadas de acordo Poleksić e Tutundžić (1994), que considera os graus de severidade em relação aos critérios de intensidade e de localização das lesões: a) quanto à intensidade: alterações leves, moderadas ou severas; b) quanto à localização: focal, multifocal ou coalescente.

Para favorecer a comparação das lesões causadas pelos distintos tratamentos, foi estabelecida uma escala numérica de intensidade (leve: 1; moderada: 2; severa: 3) e de abrangência da lesão (focal: 1; multifocal: 2; coalescente: 3). O grau de alteração de cada brânquia analisada foi obtido pela multiplicação dos valores atribuídos à intensidade e a abrangência da lesão. Dessa forma, o grau de lesão pode variar em uma escala de 0 a 9, sendo que o valor zero indica ausência de qualquer sinal de lesão e o valor 9 a maior intensidade e abrangência das lesões.

### **Análise estatística**

No teste de toxicidade aguda, a concentração letal em 4 h (CL<sub>50-4h</sub>) foi determinada através do método aparado de Spearman-Kärber, com 95% de intervalo confiança (Hamilton et al., 1977) e complementado com análise de regressão linear. Os valores de intensidade das lesões histológicas foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar as médias entre os tratamentos de efeito anestésico foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilks e a homocedasticidade da variância aplicando o teste de Levene. Uma vez encontrada a diferença entre os tratamentos (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

No teste de toxicidade aguda, não foi observada mortalidade nos grupos controle ou no tratamento com a menor concentração do OE (20 mg L<sup>-1</sup>) durante o período de 4 h de exposição a que os juvenis de *R. quelen* foram submetidos. A taxa de mortalidade entre os peixes expostos a 50, 80, 110 e 140 mg L<sup>-1</sup> de OE foi de  $6,7 \pm 0,5$ ;  $56,7 \pm 1,7$ ;  $83,3 \pm 1,2$  e  $100,0 \pm 0,0$  %, respectivamente. Os peixes apresentaram mortalidade diretamente associada ao aumento da concentração do OE de *M. piperita*, com CL<sub>50</sub> estimada em 75 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1). Porém, suportaram maiores concentrações quando comparados com juvenis de tilápia *O. niloticus* (10 g), com CL<sub>50</sub> de 40 mg L<sup>-1</sup> (Hashimoto et al., 2016) e juvenis do pirarucu *A. gigas* (35 g), com CL<sub>50</sub> de 38 mg L<sup>-1</sup> (Malheiros et al., 2016), se mostrando mais tolerantes à exposição ao OE.

Após a exposição de quatro horas, os grupos controle apresentaram maior integridade da membrana branquial, sem a presença de algumas lesões, tais como: descolamento do epitélio da lamela secundária, hiperplasia com fusão das lamelas secundárias, aneurisma, dilatação do seio venoso e congestão na base da lamela secundária (Tabela 1). A presença da dilatação do seio venoso e o aneurisma se manteve constante entre as concentrações de 20 e 140 mg L<sup>-1</sup>. Quando comparado com os peixes dos grupos controle, foi observada maior intensidade da lesão de congestão do seio venoso da lamela primária apenas a partir da concentração de 110 mg L<sup>-1</sup>.

A intensidade e a abrangência das alterações branquiais aumentaram diretamente com a concentração do OE de *M. piperita*. Essas alterações morfológicas (Figura 2) podem indicar o desenvolvimento de estratégias adaptativas pelos peixes para a conservação de algumas funções fisiológicas importantes, tais como a troca de gases, o equilíbrio ácido-base, a osmoregulação e a excreção dos compostos nitrogenados (Barbieri et al., 2015). Em nenhuma das concentrações testadas com o OE de *M. piperita* foi observado o grau máximo de lesão nas brânquias de juvenis de *R. quelen*, resultado da combinação de máxima intensidade da lesão (severa) e da sua maior abrangência (coalescente).

Aparentemente, a sensibilidade das brânquias de jundiá expostas ao óleo essencial de *M. piperita* foi manifestada pelo predomínio de algumas lesões, entre elas: o descolamento do epitélio da lamela secundária; o edema justalamelar; a hiperplasia da lamela secundária, interlamelar e com fusão das lamelas secundárias. De acordo com

Ferguson et al. (1990), a hiperplasia interlamelar e da lamela secundária são possíveis estratégias adaptativas para reagir contra a presença de agentes irritantes, atuando como barreira contra a entrada de xenobióticos na corrente sanguínea, especialmente em condições desfavoráveis e constantes. A hiperplasia com fusão da lamela secundária também é considerada um mecanismo natural de defesa para proteger o epitélio da lamela do contato direto com agentes tóxicos e estressores (Heath, 1987). A fusão lamelar observada neste estudo reduz a área superficial das brânquias e dessa forma o contato com o agente tóxico, mas também reduz a capacidade branquial para a troca de gases. Neste contexto, esta alteração inibe a respiração, secreção e funções excretoras das brânquias (Dey et al., 2015).

Merece destaque o fato de que o aneurisma foi uma lesão observada exclusivamente nos peixes expostos ao OE de *M. piperita*. Essas lesões são provavelmente resultantes da ruptura de células pilares causadas por xenobióticos (Winkaler et al., 2007), que prejudicam a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue (Heath, 1987). Esse tipo de lesão pode ainda ser decorrente de alterações primárias como hiperplasia da lamela secundária e de edema justalamelar (Bernet et al., 1999). Dessa forma, a exposição contínua por quatro horas dos juvenis de jundiá ao OE foi capaz de provocar alterações teciduais e até mesmo lesões branquiais, indicando uma evidente condição de estresse.

As lesões branquiais observadas podem causar redução da capacidade respiratória, causando assim a morte dos peixes quando submetidos a altas concentrações de *M. piperita*. No entanto, é importante destacar que os peixes saudáveis não necessariamente são caracterizados pela ausência de histopatologia, eles também podem apresentar distúrbios estruturais moderados ou leves reações inflamatórias (Bernet et al., 2004), como aquelas observadas nos peixes originários dos grupos controle deste estudo, onde a máxima severidade das poucas lesões apresentadas foi de grau 2.

Durante os ensaios de avaliação do efeito anestésico, todas as concentrações testadas do OE de *M. piperita* induziram os peixes até o último estágio comportamental de anestesia (A5) e da recuperação (R4) (Tabela 2). Nenhuma mortalidade foi registrada durante a realização do teste ou mesmo depois de 24 h da exposição. O estágio A1 foi atingido imediatamente após a exposição dos peixes ao OE em todas as concentrações testadas. Concentrações iguais ou superiores a 80 mg L<sup>-1</sup> promoveram a anestesia profunda (A5) com cerca de 4 min de

exposição, enquanto que na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> foi necessário um tempo aproximado de 6 min.

A concentração de 140 mg L<sup>-1</sup> apresentou o maior tempo ( $\approx$  11 min) para a completa recuperação dos peixes após a anestesia. O efeito depressor do OE de *M. piperita* é resultado da ação do mentol sobre o ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>), considerado um neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) (Zhang et al., 2008). A estimulação do GABA<sub>A</sub> por fármacos agonistas promove a hiper-polarização da membrana celular, causando depressão do SNC e consequente anestesia (Guénette et al., 2007).

O efeito anestésico do mentol também foi constatado para outras espécies de peixes, sendo os resultados semelhantes aos observados no presente trabalho, com correlação negativa entre a concentração da substância e o tempo necessário para a indução do último estágio de anestesia. Esse padrão foi observado para juvenis de dourado (*Salminus brasiliensis*) (194 g) submetidos a concentrações variando entre 60 e 150 mg L<sup>-1</sup> (Pádua et al., 2010) e para juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (89 g) tratados com concentrações entre 50 e 250 mg L<sup>-1</sup> (Façanha e Gomes, 2005). No presente trabalho, foi observada uma estabilização do tempo de indução à anestesia a partir de 80 mg L<sup>-1</sup> de OE de *M. piperita*. Resultado semelhante foi observado a partir da exposição a 150 mgL<sup>-1</sup> de mentol para juvenis de tambaqui *C. macropomum* (Façanha e Gomes, 2005).

Neste estudo, foi possível observar que a concentração de 80 mg L<sup>-1</sup> do OE de *M. piperita* pôde induzir o estágio de anestesia profunda em juvenis de *R. quelen*, necessitando para isso do tempo de exposição semelhante ao necessário para as concentrações mais elevadas testadas. Essa possibilidade reduz o efeito de possíveis alterações nas taxas metabólicas, no consumo de oxigênio, na pressão arterial e nas respostas fisiológicas do sangue ocasionadas pela exposição às altas concentrações de anestésicos.

De acordo com os critérios para seleção de um agente anestésico eficaz, é recomendado que a anestesia seja induzida rapidamente (até 3 min) e que promova uma recuperação rápida (até 10 min) após a transferência dos peixes para água livre do produto anestésico (Park et al., 2003). Condição próxima a essa foi observada para os juvenis de *R. quelen* submetidos a concentrações entre 80 e 110 mg L<sup>-1</sup> de *M. piperita*, sendo a concentração 80 mgL<sup>-1</sup> a indicada por ser a menor concentração que atende aos critérios recomendados para a seleção de um anestésico eficaz.

## Conclusões

1. O óleo essencial de *Mentha piperita* é tóxico para juvenis de *Rhamdia quelen* quando exposto por quatro horas em concentrações superiores a 50 mg L<sup>-1</sup>, apresentando CL<sub>50-4h</sub> de 75 mg L<sup>-1</sup>.

2. As brânquias dos juvenis de *Rhamdia quelen* podem ser consideradas boas indicadoras da toxicidade causada pela exposição prolongada ao óleo essencial de *Mentha piperita*. Concentrações a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> provocam lesões nos tecidos branquiais após quatro horas de exposição.

3. A concentração de 80 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *Mentha piperita* é recomendada para induzir a anestesia em juvenis de *Rhamdia quelen*, promovendo a anestesia profunda em aproximadamente quatro minutos de exposição e a completa recuperação dos peixes em cerca de sete minutos após retorno a água livre do anestésico.

## Agradecimentos

Ao Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental pelo fornecimento do óleo essencial de *Mentha piperita*. Ao Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da Universidade Federal de Santa Catarina pela cessão da infraestrutura necessária para as análises histológicas. Ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade a EZF.

## Referências

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v.39, p.291-299, 2009.

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. **Aquaculture Research**, v.46, n.3, p.564-571, 2015.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p.25-34, 1999.

BERNET, D.; SCHMIDT-POSTHAUS, H.; WAHLI, T.; BURKHARDT-HOLM, P.; Evaluation of two monitoring approaches to

assess effects of waste water disposal on histological alterations in fish. **Hydrobiologia** v.524, p.53–66. 2004.

DEY S.; RAJGURU, U.; PATHAK, D.C.; GOSWAMI, U.C. Analysis of gill structure from a fresh water fish (*Heteropneustes fossilis*) exposed to bleached sulfite pulp mill effluents. **Microscopy and Microanalysis**, v.21, p.385–391, 2015.

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

FDA/CVM. **Guidance for industry. Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish.** Maryland, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 2007. 3p. Disponível em: <http://www.regulations.gov>. Acesso em: 14 de Nov. 2017.

FERGUSON, H.; POPPE, T.; SEPARE, D. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.8, p.225-231, 1990.

GUÉNETTE, S.A.; UHLAND, F.C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, p.262-265, 2007

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, N.V. Trimmed Spearman–Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v.7, p.714–719, 1977.

HASHIMOTO, G.S.O.; NETO, F.M.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v.450, p.182–186, 2016.

HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology.** New York. CRC. Press, 1987. 384p.

HISANO, H.; ISHIKAWA, M.M.; FERREIRA, R.A.; BULGARELLI, A.L.A.; COSTA, T.R.; PÁDUA, S.B. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia sp.* **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v.30, n.3, p.303-307, 2008.

ISCAN, G.; DEMIRCI, F.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K.H.C. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p.3943-3946, 2002.

MALHEIROS, D.F.; MACIEL, P.O.; VIDEIRA, M.N.; TAVARES-DIAS, M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (Pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). **Aquaculture**, v.455, p.81–86, 2016.

MORAIS, S.R.; OLIVEIRA, T.L.S.; BARA, M.T.F.; CONCEIÇÃO, E.C.; REZENDE, M.H., FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/363919>.

NTP. **Carcinogenesis studies of eugenol**: Relatório do ano de 1983. North Carolina, National Toxicology Program, 1983. 165p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 14 de nov. 2017.

PÁDUA, S.B.; PIETRO, P.S.; IGLESIAS-FILHO, P.S.; ISHIKAWA, M.M.; HISANO, H. Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, n.2, p.143–148, 2010.

PARK, I.S.; JO, J.H.; LEE, S.J.; KIM, Y.A.; PARK, K.E.; HUR, J.W.; YOO, J.S.; SONG, Y.C. Anaesthetic effect of lidocaine hydrochloride–sodium bicarbonate and MS-222 on the greenling (*Hexagram mosotakii*). **Journal of the Korean Fisheries Society**, v.36, p.449-453, 2003.

PARK, M.O.; IM, S.Y.; SEOL, D.W.; PARK, I.S. Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, v.287, p.427-430, 2009.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sub lethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd R. (Eds.), Sub lethal and chronic effects of pollutants on fresh water fish. **Fishing News Books**, p.339-352. 1994.

ROBERTS, R.J. **Fish Pathology**. Wiley & Sons, 2012. 590 p.

SILVA, L.L.; PARODI, T.V; RECKZIEGEL, P; GARCIA, V.O; BURGER, M.E; BALDISSEROTTO, B; MALLMANN, C.A; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.350, p.91-97, 2012.

SILVA, L.L.; SILVA, D.T.; GARLET, Q.I.; CUNHA, M.A.; MALLMANN, C.A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S.J.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v.11, p.443–451. 2013.

TRUSHENSKI, J. T.; BOWKER, J. D.; COOKE, S. J.; ERDAHL, D.; BELL, T.; MACMILLAN, J. R.; YANONG, R. P.; HILL, J. E.; FABRIZIO, M. C.; GARVEY, J. E.; SHARON, S. Issues regarding the use of sedatives in fisheries and the need for immediate-release options. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.142, n.1, p.156-170, 2013.

WINKALER, E.U.; SANTOS, T.R.M.; MACHADO-NETO, J.G.; MARTINEZ, C.B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the Neotropical fresh water fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.145, n.2, p.236–244, 2007.

ZHANG, X.B.; JIANG, P.; GONG, N.; HU, X.L; FEI, D; XIONG, Z.Q; XU, L.; XU, T.L. Atypic GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. **Plos One**, v.3, n.10, p.1-11, 2008.

## Tabelas

**Tabela 1.** Valor médio do grau de lesão branquial observado em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* (n=9) expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* por um período de quatro horas.

Lesão branquial	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )						
	0 + álcool	0	20	50	80	110	140
Descolamento do epitélio da lamela secundária	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	1,8 <sup>bc</sup>	1,9 <sup>bc</sup>	2 <sup>abc</sup>	4 <sup>ab</sup>	6 <sup>a</sup>
Hiperplasia com fusão das lamelas secundárias	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	1 <sup>bc</sup>	2,8 <sup>abc</sup>	3 <sup>ab</sup>	6 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>
Aneurisma	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>
Dilatação do seio venoso	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1,9 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
Congestão na base da lamela secundária	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
Hiperplasia da lamela secundária	1,1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	2 <sup>bc</sup>	2,8 <sup>abc</sup>	3 <sup>ab</sup>	5,8 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>
Hiperplasia interlamelar	2 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	5,8 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>
Edema justalamelar	1,2 <sup>c</sup>	1,1 <sup>c</sup>	2 <sup>bc</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	4 <sup>ab</sup>	6 <sup>a</sup>
Congestão do seio venoso da lamela primária	1,7 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	4,2 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>

\*Valores sobrescritos com letras distintas em uma mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

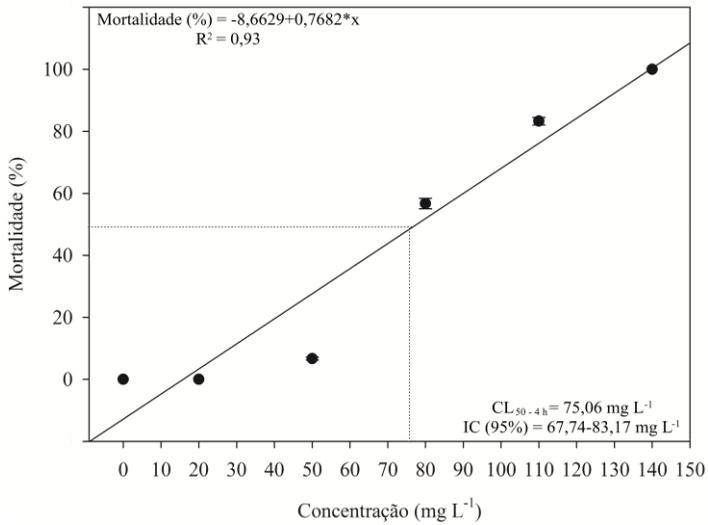
**Tabela 2.** Tempo (em segundos) de indução aos diferentes estágios de anestesia e de recuperação dos juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* (n=9) expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita*. Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

Concentração (mgL <sup>-1</sup> )	Estágios de anestesia (A) / Estágios de recuperação (R)			
	A2	A3	A4	A5
50	60,3 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>	90,3 $\pm$ 25,3 <sup>a</sup>	221,3 $\pm$ 59,7 <sup>a</sup>	355 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>
80	81,0 $\pm$ 19,8 <sup>a</sup>	97,7 $\pm$ 22,2 <sup>a</sup>	141,3 $\pm$ 65,9 <sup>a</sup>	247,0 $\pm$ 13,9 <sup>b</sup>
110	64,7 $\pm$ 27,2 <sup>a</sup>	91,0 $\pm$ 24,6 <sup>a</sup>	141,7 $\pm$ 49,1 <sup>a</sup>	270,7 $\pm$ 18,6 <sup>b</sup>
140	49,7 $\pm$ 11,5 <sup>a</sup>	75,7 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>	82,3 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	242,3 $\pm$ 12,5 <sup>b</sup>
	R1	R2	R3	R4
50	19,0 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>	127,7 $\pm$ 113,5 <sup>a</sup>	185,3 $\pm$ 113,7 <sup>b</sup>	222,7 $\pm$ 110,6 <sup>b</sup>
80	62,0 $\pm$ 25,1 <sup>a</sup>	153,7 $\pm$ 104,7 <sup>a</sup>	335,3 $\pm$ 51,0 <sup>b</sup>	413,0 $\pm$ 56,8 <sup>b</sup>
110	87,0 $\pm$ 69,7 <sup>a</sup>	184,7 $\pm$ 81,7 <sup>a</sup>	383,7 $\pm$ 25,0 <sup>ab</sup>	409,0 $\pm$ 15,2 <sup>b</sup>
140	158,0 $\pm$ 63,9 <sup>a</sup>	281,7 $\pm$ 20,5 <sup>a</sup>	609,0 $\pm$ 113,3 <sup>a</sup>	663,0 $\pm$ 59,7 <sup>a</sup>

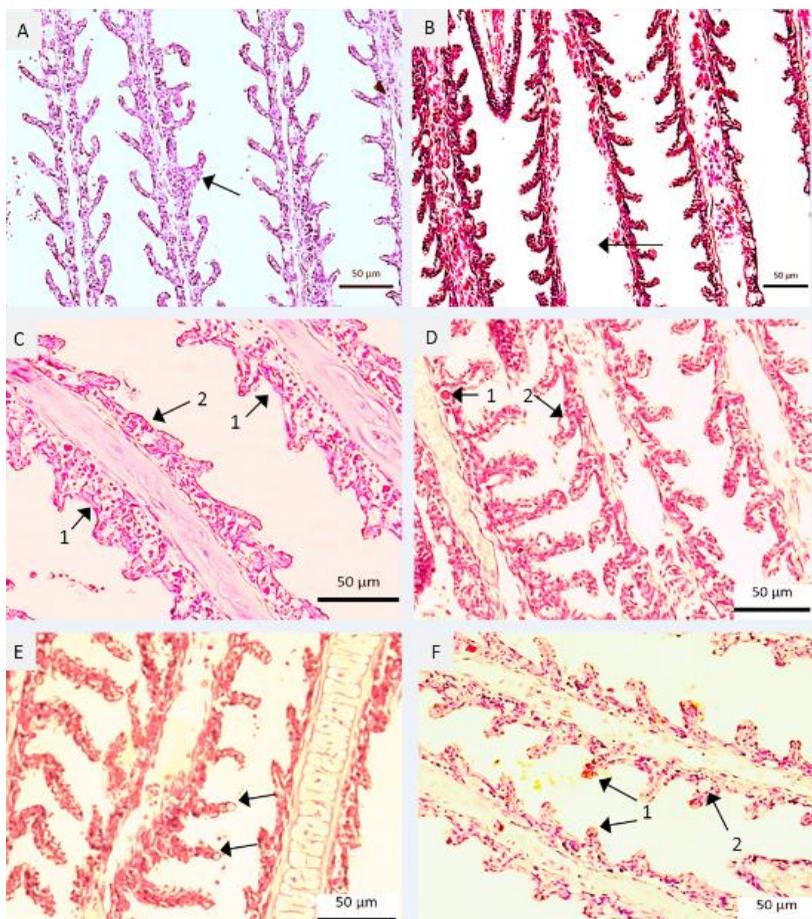
\*Valores sobrescritos com letras distintas em uma mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

\*\*A2 = natação lenta, A3 = perda do equilíbrio, A4 = repouso, A5 = paralização do batimento opercular (anestesia profunda), R1 = retorno do movimento opercular, R2 = início do movimento, R3 = início da natação, R4 = recuperação.

## Figuras



**Figura 1.** Representação da taxa de mortalidade de juvenis de *Rhamdia quelen* expostos por quatro horas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Mentha piperita* (n=30).



**Figura 2.** Fotomicrografia das principais lesões apresentadas nas brânquias de *Rhamdia quelen* expostas por quatro horas à água de cultivo com adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Mentha piperita*. A: expostos à água de cultivo (controle), com a presença de hiperplasia da lamela secundária; B: exposição à 20 mg L<sup>-1</sup> - congestão do seio venoso da lamela primária; C: exposição à 50 mg L<sup>-1</sup> - hiperplasia interlamelar (1) e com fusão das lamelas secundárias (2); D: exposição à 80 mg L<sup>-1</sup> - congestão na base da lamela secundária (1) e descolamento do epitélio da lamela secundária (2); E: exposição à 110 mg L<sup>-1</sup> - dilatação do seio venoso; F: exposição à 140 mg L<sup>-1</sup> - aneurisma (1) e edema justalamelar (2). Vale destacar que essa figura retrata apenas uma imagem de parte da brânquia de um peixe de cada uma das concentrações testadas, tendo sido analisados nove peixes de cada tratamento. O grau de severidade de cada uma das lesões observadas em cada concentração testada está expresso na Tabela 2.



## CAPÍTULO II

### BUTIRATO DE SÓDIO E ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* NA DIETA DO JUNDIÁ: DESEMPENHO, HISTOLOGIA, ESTRESSE E DESAFIO AO *Ichthyophthirius multifiliis*

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho zootécnico, a mucosa intestinal, a resistência ao estresse e a reação à infestação contra o parasito *Ichthyophthirius multifiliis* de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* suplementadas com óleo essencial de *Mentha piperita* ou butirato de sódio em suas dietas. As larvas ( $2,9 \pm 0,5$  mg e  $7,9 \pm 1,3$  mm) foram distribuídas, aleatoriamente, em 15 unidades experimentais contendo 20 L de água (60 larvas por unidade experimental). Cinco dietas foram utilizadas durante 30 dias: 0% (controle), dieta isenta da inclusão de aditivo; OE1% e OE2%, inclusão de 1% ou 2% de óleo essencial de *M. piperita* por kg de ração, respectivamente; BS0,25% e BS0,50%, inclusão de 0,25% ou 0,50% de butirato de sódio por kg de ração, respectivamente. As diferentes dietas testadas não afetaram a resistência dos peixes ao estresse pela exposição ao ar e à água salinizada. Da mesma forma, a suplementação dietética não foi capaz de inibir a infestação por *I. multifiliis* no tegumento dos peixes. Os peixes suplementados com 0,50% de butirato de sódio (BS0,50%) em suas dietas apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros zootécnicos analisados ( $p < 0,05$ ). Quando comparado à dieta controle, a suplementação de BS0,50% aumentou tanto a largura dos vilos quanto a quantidade de células caliciformes presentes na mucosa intestinal, ambas em aproximadamente 50%. Essas descobertas podem ter importantes implicações na produção de larvas de *R. quelen* e devem ser levadas adiante com novos estudos.

**Palavras-chave:** ácidos orgânicos; extrato vegetal; larvicultura; sobrevivência; *Rhamdia quelen*; infestação.

#### ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the zootechnical performance, intestinal mucosa, resistance to stress and reaction to infestation against the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* of jundiá

*Rhamdia quelen* larvae supplemented with essential oil of *Mentha piperita* or sodium butyrate in their diets. The larvae ( $2.9 \pm 0.5$  mg and  $7.9 \pm 1.3$  mm) were randomly distributed in 15 experimental units containing 20 L of water (60 larvae per experimental unit). Five diets were used during 30 days: 0% (control), diet free of additive inclusion; OE1% and OE2%, inclusion of 1% or 2% of essential oil of *M. piperita* per kg of feed, respectively; BS0.25% and BS0.50%, inclusion of 0.25% or 0.50% of sodium butyrate per kg of feed, respectively. The different diets tested did not affect the resistance of larvae to stress due to exposure to air and saline water. Likewise, dietary supplementation was not able to inhibit *I. multifiliis* infestation in fish tegument. The larvae supplemented with 0.50% sodium butyrate (BS0.50%) in their diets presented better performance in all zootechnical parameters analyzed ( $p < 0.05$ ). When compared to the control diet, supplementation of BS0.50% increased both the villi width and the amount of goblet cells present in the intestinal mucosa, both by approximately 50%. These findings may have important implications for the production of *R. quelen* larvae and should be carried forward with further studies.

**Keywords:** organic acids; vegetable extract; larviculture; survival; diet; infestation.

## INTRODUÇÃO

Muitas perdas na produção de peixes cultivados estão associadas ao parasito *Ichthyophthirius multifiliis*, um protozoário cosmopolita responsável por uma grande parcela de parasitose em cultivos de água doce, conhecida como "doença dos pontos brancos" ou ictiofitiríase (VALLADÃO *et al.*, 2016). Este parasita dá origem a morbidade (OSMAN *et al.*, 2009) e causa significativa perda econômica para a produção (BUCHMANN *et al.*, 2001). Alguns dos principais produtos que já foram utilizados no tratamento da ictiofitiríase são verde malaquita (SRIVASTAVA *et al.*, 2004), formalina, sulfato de cobre (FARMER *et al.*, 2013) e permanganato de potássio (RINTAMÄKI-KINNUNEN *et al.*, 2005). Porém, por causa dos indesejáveis efeitos sobre o meio ambiente (RICO e VAN DEN BRINK, 2014), em animais e humanos (SAPKOTA *et al.*, 2008), o uso dessas substâncias foi desencorajado e até mesmo proibido, como no caso do verde malaquita e da formalina.

Por outro lado, medicamentos à base de plantas e ácidos orgânicos apresentam grande potencial como alternativa contra

infecções em aquicultura, porque são biodegradáveis e exibem uma atividade antimicrobiana contra várias bactérias, parasitas e fungos. Além disso, são uma alternativa preventiva na manutenção da saúde de peixes cultivados, tanto por atuar no trato intestinal inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente as Gram-negativas, quanto auxiliando na digestibilidade e na absorção de nutrientes, condições que podem beneficiar o desempenho zootécnico dos animais (ZHENG, 2009; HOSSAIN *et al.*, 2007; DEFOIRD *et al.*, 2009; TALPUR, 2014; ADEL *et al.*, 2015; VALLADÃO *et al.*, 2015).

Dentre as plantas merece destaque a *Mentha piperita* (também conhecida como Peppermint), uma erva perene pertencente à família Lamiaceae. É uma planta híbrida resultante do cruzamento entre Spearmint (*Mentha spicata*) e Watermint (*Mentha aquatica*) (ISCAN *et al.*, 2002). Alguns autores encontraram resultados promissores com a inclusão desta erva na alimentação de peixes. ADEL *et al.* (2015) observaram que a adição do óleo essencial (OE) de *M. piperita* à dieta promoveu um maior crescimento e melhor conversão alimentar, além de melhorar os principais parâmetros hematológicos e imunológicos do caspian white *Rutilus frisii kutum*. Outros autores observaram o desenvolvimento de atividade anti-helmíntica do *M. piperita* em pirarucu *Arapaima gigas* contra o monogêneo *Dawestrema spp* (MALHEIROS *et al.*, 2016); além da diminuição em até 70% da prevalência de monogêneos *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* na tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (HASHIMOTO *et al.*, 2016); e efeito citotóxico contra *I. multifiliis* em estudo realizado *in vitro* (VALLADÃO *et al.*, 2016).

Dentre os sais orgânicos, o butirato de sódio tem recebido grande destaque devido aos efeitos positivos causados no trato intestinal de diversos animais (GUILLOTEAU *et al.*, 2010). Estudos indicam que o butirato de sódio, além de proporcionar energia para as células epiteliais, aumenta marcadamente a proliferação celular epitelial e sua diferenciação, melhorando também a função de barreira do cólon. Em um estudo realizado com suínos, a suplementação dietética de 0,17% de butirato de sódio aumentou a proliferação celular no íleo de 33%, resultando no crescimento adicional em 30% no comprimento dos vilos (GALFI e BOKORI, 1990).

Dentre as espécies de peixes que apresentam um grande potencial para a aquicultura continental no sul do Brasil, merece destaque o jundiá (*Rhamdia quelen*), principal espécie nativa produzida nesta região (BALDISSEROTTO, 2009). Esse potencial de produção tem sido

atribuído ao fato da espécie apresentar comportamento dócil em cativeiro e aparentemente um baixo nível de estresse quando submetida aos principais manejos de cultivo (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003). Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo foi de avaliar o desenvolvimento zootécnico, a mucosa intestinal, a resistência ao estresse e a infestação contra o parasito *I. multifiliis* de larvas de jundiá *R. quelen* alimentadas com dietas suplementadas com óleo essencial de *M. piperita* ou butirato de sódio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), segundo procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA / UFSC, protocolo nº 3451200917. As larvas de *R. quelen* foram obtidas a partir da reprodução induzida de reprodutores selvagens originários do Alto rio Uruguai. Logo após a abertura da boca, as larvas foram alimentadas com náuplios de *Artemia* sp. durante 15 dias. Após este período, 900 larvas ( $2,9 \pm 0,5$  mg e  $7,9 \pm 1,3$  mm) foram distribuídas, aleatoriamente, em 15 unidades experimentais contendo 20 L de água (60 larvas por unidade experimental) em sistema de recirculação de água acoplado com filtro biológico, com renovação constante e mantidos em água levemente salinizada ( $2,4 \text{ g L}^{-1}$  – sal marinho sem iodo), aeração constante e submetidas ao fotoperíodo de 12 horas.

Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (8, 11, 14 e 17 h) até a saciedade aparente durante os 30 dias do experimento. Cinco dietas foram utilizadas: 0% (controle), dieta isenta da inclusão de aditivo; OE1% e OE2%, inclusão de 1% ou 2% de óleo essencial de *M. piperita* na ração, respectivamente; BS0,25% e BS0,50%, inclusão de 0,25% ou 0,50% de butirato de sódio (butirato de sódio 99%, Sigma-Aldrich, MO-USA) na ração, respectivamente. Cada tratamento consistiu em três repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

A alcalinidade, a amônia não-ionizada ( $\text{NH}_3$ ) e o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foram determinados nos dias 1º, 10º, 20º e 30º do experimento, através de um kit volumétrico (Alfa Tecnoquímica), pelo método do indofenol (KOROLEFF, 1975) e pelo método descrito por GOLTERMAN *et al.*, (1978), respectivamente. Os valores de oxigênio dissolvido, condutividade, pH e temperatura da água foram monitorados diariamente com uso de sonda multiparâmetro YSI 556 MPS®.

## Óleo essencial de *Mentha piperita*

O óleo essencial (OE) de *M. piperita* foi obtido no Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Amazonas, Brasil). As partes aéreas (folhas e/ou inflorescências) da planta foram removidas para extração do OE pelo processo de hidrodestilação. A análise química do OE foi realizada por meio de cromatografia gasosa com espectrometria de massa, seguindo procedimento descrito por MORAIS *et al.* (2012), cuja composição química está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Mentha piperita*.

<b>Pico</b>	<b>Quant %</b>	<b>IR</b>	<b>Identificação</b>
1	t	929	alfa-tuieno
2	0,8	937	alfa-pineno
3	0,1	953	3-metil-cicloexanona
4	0,4	975	sabineno
5	1,3	979	beta-pineno
6	0,6	991	mirceno
7	0,1	995	3-octanol
8	0,1	1026	orto-cimeno
9	3,5	1031	limoneno
10	2,1	1033	1,8-cineol
11	0,1	1039	<i>cis</i> -beta-ocimeno
12	0,1	1061	gama-terpineno
13	0,2	1069	<i>cis</i> -hidrato de sabineno
14	0,1	1089	terpinoleno
15	0,1	1099	linalol
16	0,1	1147	neo-isopulegol
17	0,1	1150	para-ment-3-en-8-ol
18	11,0	1156	mentona
19	22,5	1167	mentofurano
20	27,5	1177	mentol
21	1,0	1179	4-terpineol
22	0,2	1184	iso-mentol
23	0,3	1190	alfa-terpineol
24	12,8	1241	pulegona
25	0,6	1255	piperitona
26	0,7	1276	acetato de neo-mentila
27	12,5	1294	acetato de mentila
28	0,5	1416	trans-beta-cariofileno
29	0,1	1479	lactona de menta

\*t: traços, IR: índice de retenção, Total identificado: 99,5%.

## Preparação das dietas

A ração experimental foi formulada e produzida no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas – LABNUTRI (UFSC), com nível de proteína bruta (PB) 44,93%, extrato etéreo (EE) 9,83% e umidade 24%.

O aditivo alimentar butirato de sódio foi incorporado à ração no momento de sua formulação e preparação. Já o OE de *M. piperita* foi adicionado seguindo a metodologia modificada de DAIKIRI *et al.* (2013), utilizando o método convencional de aspensão com pulverizador manual e diluição de 1,5 ml de OE em 100 g de álcool PA 99,8% por quilo de ração. Após as inclusões, as rações foram secas à temperatura ambiente por 24 h e posteriormente armazenadas a -18°C até sua utilização.

## Análise de desempenho

Após o período experimental, foram quantificadas as larvas vivas e medido o comprimento total das larvas, sendo posteriormente pesado, individualmente, o lote de larvas contidas em cada unidade experimental (UE). Os seguintes parâmetros de produção foram avaliados: comprimento médio final, peso médio final, biomassa final (BF) ( $BF = \text{peso final médio} \times \text{n}^\circ \text{ de sobreviventes}$ ) e taxa de sobrevivência (S) [ $S = (\text{População final} \times 100) / \text{população inicial}$ ].

## Avaliação de resistência ao estresse e desafio a infestação com *I. multifiliis*

Foi estimado o vigor das larvas através do teste de resistência ao estresse por exposição ao ar, com metodologia modificada de ATENCIO-GARCIA *et al.* (2003), e teste de resistência à salinidade. Nove larvas de cada UE foram capturadas aleatoriamente com um puçá pequeno e malha de 2 mm e expostas ao seu respectivo teste. Para o de resistência ao ar, as larvas foram colocadas em papel absorvente e expostas ao ar durante 60 min. Já para o de resistência à salinidade, as larvas foram imersas em água com salinidade de 20 g L<sup>-1</sup> por 30 min. Após esses períodos, as larvas foram transferidas para um recipiente com água retirada da própria UE e avaliada a sobrevivência imediatamente após o retorno e depois de 24 h.

Ao final do experimento, dez peixes de cada UE foram transferidos para tanques-rede circulares com 20 cm de diâmetro (10 L) e estocados em um tanque de fibra (volume de 1.000 L) em ambiente

externo, experimentalmente infestado com *I. multifiliis*. Os peixes foram observados diariamente até o aparecimento dos sinais clínicos da infestação (manchas brancas). Constatada a patologia, foram coletados e uma raspagem foi realizada para remoção e contagem dos trofontes. A infestação foi realizada pelo método de coabitação por quatro dias com juvenis de carpa-capim *Ctenopharingodon idella* (n=40) parasitados com *I. multifiliis*. Os peixes (carpa-capim) infestados foram mantidos fora dos tanques-rede, seguindo a metodologia, descrita por ABDEL-HAFEZ *et al.* (2014b), modificada. Os juvenis de carpa-capim foram obtidos de uma unidade experimental de piscicultura e já se encontravam infestados com *I. multifiliis*.

Para coleta dos trofontes os peixes foram anestesiados com eugenol (75 mg L<sup>-1</sup>) e eutanasiados por comoção cerebral. Os trofontes foram raspados da superfície corporal com auxílio de lamínula e transferidos para álcool 70%, com volume padronizado (30 mL) para todas as coletas. Para contagem, uma alíquota de 1 mL da solução foi retirada após homogeneização da amostra, e os trofontes foram quantificados a partir da contagem direta com o auxílio de câmara de Sedgewick-Rafter em microscópio óptico. Este processo foi realizado três vezes por amostra. Calculou-se a quantidade média de trofontes por mL e estimou-se a contagem total para o volume da amostra, assim registrada a taxa de prevalência (número de peixes infectados / número de peixes analisados x 100) e a intensidade média da infestação (número total de trofontes na amostra / número de peixes infestados pelos trofontes).

### Análises histológicas

Ao final dos 30 dias de experimento, para auxiliar a avaliação da suplementação dietética com butirato de sódio e óleo essencial de *M. piperita*, foi amostrada a porção inicial do intestino (três peixes de cada UE). O material coletado foi identificado, fixado em solução de formalina tamponada 10% por 24 h, lavado em álcool 70% (3 × 15 min) e armazenado em álcool 70% até o processamento para análise histológica.

Os intestinos foram desidratados em uma série ascendente de soluções alcoólicas (70, 80, 90 e 100%), processados em parafina seguindo técnicas de rotina para cortes transversais de 3 µm de espessura, usando um micrótomo manual Leica RM 2245, e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE). As imagens foram capturadas usando um microscópio de luz Zeiss AxioVert.A1

com uma câmera acoplada (Axiocam ERc5s), e analisadas com o auxílio de software de análise de imagem Zen Lite 2012.

As análises do intestino consistiram em determinar a quantidade das vilosidades, assim como seu dimensionamento (comprimento, largura e perímetro), além da quantidade de células caliciformes contida nos vilos da mucosa intestinal.

### Análise estatística

Para comparar as médias entre os tratamentos foram analisadas a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilks e a homocedasticidade da variância aplicando o teste de Levene. Uma vez encontrada a diferença entre os tratamentos (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o software Statistica® versão 7.0.

## RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade de água apresentaram valores semelhantes entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), sendo considerados adequados para a espécie estudada (BALDISSEROTTO e SILVA 2004), com valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de oxigênio dissolvido  $7,2 \pm 0,22$  mg L<sup>-1</sup>; salinidade  $2,4 \pm 0,08$  g L<sup>-1</sup>; temperatura  $25,2 \pm 0,13$  °C; pH  $7,83 \pm 0,21$ ; condutividade  $4.352,1 \pm 21,54$   $\mu$ S cm<sup>-1</sup>. A amônia não-ionizada foi de  $0,08 \pm 0,11$  mg L<sup>-1</sup>, o nitrito de  $0,01 \pm 0,01$  mg L<sup>-1</sup> e a alcalinidade foi de  $48,2 \pm 5,63$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

As diferentes dietas testadas não afetaram a resistência das larvas ao estresse pela exposição ao ar ou a água salinizada, havendo semelhança na sobrevivência ( $p > 0,05$ ) dos peixes submetidos aos distintos tratamentos (Tabela 2).

A suplementação dietética com óleo essencial de *M. piperita* (1 ou 2%) ou com butirato de sódio (0,25 ou 0,50%) não foi capaz de inibir a infestação por *I. multifiliis* no tegumento dos peixes. A intensidade média dos trofontes no muco das larvas de *R. quelen* foi semelhante entre as dietas utilizadas no experimento ( $p > 0,05$ ). Controle:  $429,0 \pm 40,0$ ; OE1%:  $442,3 \pm 47,0$ ; OE2%:  $410,0 \pm 68,0$ ; BS0,25%:  $434,0 \pm 61,0$  e BS0,50%:  $390,3 \pm 85,0$ , sendo observado o valor de 100% de prevalência em todos os tratamentos.

As larvas suplementadas com 0,50% de butirato de sódio (BS0,50%) em suas dietas apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros zootécnicos analisados ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais

tratamentos (Tabela 3), exceto ao BS0,25% que foi semelhante em relação ao comprimento, biomassa e sobrevivência final. A suplementação por 30 dias com óleo essencial de *M. piperita*, em 1 ou 2 %, não melhorou significativamente a performance do desempenho zootécnico de *R. quelen*, havendo semelhança quando comparado com o tratamento controle ( $p > 0,05$ ). Os peixes alimentados com ração suplementada em 0,50% de butirato de sódio apresentaram peso médio final e sobrevivência aproximadamente 54% e 70% superior aos peixes do tratamento controle, respectivamente.

Tabela 2. Valores de sobrevivência (%) acumulada até às 24 h (média  $\pm$  desvio padrão) de larvas de jundiá *Rhamdia quelen* alimentadas por 30 dias com diferentes dietas e submetidas à exposição ao ar (60 min) e à água salinizada (20 g L<sup>-1</sup>) por 30 minutos. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio.

Dietas	Desafio ao estresse	
	Exposição ao ar	Salinidade
Controle	70,3 $\pm$ 13,8	88,9 $\pm$ 9,1
OE1%	66,7 $\pm$ 9,1	88,9 $\pm$ 15,7
OE2%	66,7 $\pm$ 15,7	81,5 $\pm$ 5,2
BS0,25%	85,2 $\pm$ 13,8	88,9 $\pm$ 15,7
BS0,50%	77,8 $\pm$ 15,7	85,9 $\pm$ 5,2

\*Não foram detectadas diferenças significativas entre esses parâmetros ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3. Desempenho zootécnico de larvas de *Rhamdia quelen* (média  $\pm$  DP) alimentadas por 30 dias com diferentes dietas. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio.

Dietas	Comprimento	Peso Médio	Biomassa	Sobrevivência
	Médio Final (cm)	Final (g)	Final (g)	(%)
Controle	3,65 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,52 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	14,81 $\pm$ 1,50 <sup>b</sup>	47,77 $\pm$ 4,15 <sup>c</sup>
OE1%	3,58 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,49 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	18,16 $\pm$ 1,66 <sup>b</sup>	62,22 $\pm$ 5,66 <sup>bc</sup>
OE2%	3,69 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	0,52 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	17,81 $\pm$ 3,04 <sup>b</sup>	56,66 $\pm$ 5,44 <sup>c</sup>
BS0,25%	3,93 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	0,67 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	30,83 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	76,66 $\pm$ 2,72 <sup>ab</sup>
BS0,50%	4,23 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	38,91 $\pm$ 4,20 <sup>a</sup>	81,11 $\pm$ 4,15 <sup>a</sup>

\*Valores sobrescritos com letras distintas em uma mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os intestinos dos peixes originários de todos os tratamentos se encontravam íntegros, sem descolamento, sem infiltrados linfocitos e sem necrose. As larvas suplementadas com 0,50% de butirato de sódio (BS0,50%) apresentaram maior largura dos vilos do que as dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ) e maior quantidade de células caliciformes do que as larvas originárias do tratamento controle ou que foram suplementadas com o óleo essencial (Tabela 4). Ao comparar com a morfologia do tecido intestinal das larvas do tratamento controle, a suplementação de 0,50% de butirato de sódio aumentou a largura dos vilos e a quantidade de células caliciformes em aproximadamente 50%. Apesar disso, houve semelhança no número de vilos da mucosa intestinal das larvas submetidas às diferentes dietas ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4. Histomorfologia do intestino das larvas de jundiá *Rhamdia quelen* alimentadas com diferentes dietas. Controle = Ração; OE1% = Ração suplementada com 1% de óleo essencial de *Mentha piperita*; OE2% = Ração suplementada com 2% de óleo essencial de *Mentha piperita*; BS0,25% = Ração suplementada com 0,25% de butirato de sódio; BS0,50% = Ração suplementada com 0,50% de butirato de sódio.

	Dietas				
	Controle	OE1%	OE2%	BS0,25%	BS0,50%
<b>Nº de vilos</b>	14,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	9,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	11,7 ± 4,1 <sup>a</sup>
<b>Comprimento dos vilos (µm)</b>	161,5 ± 5,6 <sup>ab</sup>	127,4 ± 16,0 <sup>b</sup>	179,7 ± 19,8 <sup>ab</sup>	205,2 ± 14,7 <sup>a</sup>	175,3 ± 31,5 <sup>ab</sup>
<b>Largura dos vilos (µm)</b>	58,4 ± 5,7 <sup>b</sup>	57,0 ± 3,2 <sup>b</sup>	61,7 ± 4,4 <sup>b</sup>	69,5 ± 3,7 <sup>b</sup>	89,2 ± 6,2 <sup>a</sup>
<b>Nº de células Caliciformes</b>	9,7 ± 0,5 <sup>c</sup>	9,3 ± 0,9 <sup>c</sup>	10,7 ± 0,9 <sup>bc</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>ab</sup>	14,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>Perímetro dos vilos (µm)</b>	5.541,0 ± 463,7 <sup>ab</sup>	3.030,0 ± 50,3 <sup>b</sup>	5.184,6 ± 1.437,0 <sup>ab</sup>	6.653,5 ± 809,9 <sup>a</sup>	5.133,0 ± 1.662,0 <sup>ab</sup>

\*Valores sobrescritos com letras distintas em uma mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Durante a realização dos testes de estresse, tanto no de exposição ao ar como à água salinizada, não se observou diferença significativa na sobrevivência das larvas que receberam suplementação com butirato de sódio, *M. piperita* ou apenas a dieta controle. Estes resultados indicam que a capacidade das larvas de *R. quelen* de resistência ao estresse não é alterada pela inclusão de butirato de sódio ou do óleo essencial de *M. piperita* na dieta. Pelo contrário, a suplementação com esses aditivos têm demonstrado que tanto os ácidos orgânicos (HOSSAIN *et al.*, 2007; DEFOIRDT *et al.*, 2009), como os óleos essenciais (ADEL *et al.*; 2015; GABRIEL *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016) são alternativas preventivas na manutenção da saúde de peixes cultivados, por atuar no trato intestinal inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, principalmente as Gram-negativas, condição que auxilia na digestibilidade e na absorção de nutrientes, podendo inclusive afetar o desempenho zootécnico dos animais. Essas alterações metabólicas podem promover o declínio nos teores de gordura, triglicérides e colesterol, e dessa forma podem aumentar a capacidade cardiovascular dos peixes (TALPUR, 2014).

O melhor desempenho nos parâmetros zootécnicos proporcionado pela dieta suplementada com butirato de sódio também foi encontrado para outras espécies. Foi verificado aumento no crescimento da dourada *Sparus aurata* com a suplementação dietética de 0,3% de butirato de sódio comercial (ROBLES *et al.*, 2013) e melhoria no ganho de peso e conversão alimentar da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* e da carpa comum *Cyprinus carpio* alimentadas com dieta suplementada com butirato de sódio na proporção entre 0,5 e 1,5% (ZHENG, 2009). Essa melhoria de desempenho das larvas tem sido atribuída à ação do butirato no aumento da disponibilidade de aminoácidos essenciais e derivados de nucleotídeos, além de aumentar a atividade de transmetilação, condições que auxiliam na síntese de alguns aminoácidos (ROBLES *et al.*, 2013).

Este melhor desempenho do crescimento pode ser associado ao efeito benéfico do butirato de sódio sobre o epitélio intestinal. Alterações na morfologia intestinal são importantes e podem afetar a taxa de crescimento (TIAN *et al.*, 2017). Neste estudo, a morfologia da mucosa intestinal das larvas de *R. quelen* apresentou aumento significativo na largura dos vilos e na quantidade de células calciformes dos peixes que foram suplementados em suas dietas com 0,50% de butirato de sódio, quando comparado aos demais tratamentos. A mucosa intestinal de juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*) suplementadas com 1,5

ou 3,0 % de butirato de sódio também sofreu alteração, sendo observado um aumento na altura dos vilos (LIU *et al.*, 2014). Essa melhoria na condição intestinal tem sido atribuída à capacidade do butirato de sódio em fornecer energia para o crescimento epitelial (LIU *et al.*, 2014). Tal característica do butirato de sódio se deve principalmente pelo fato de ser uma substância solúvel em gordura e poder ser rapidamente absorvida e utilizada pelas células epiteliais entéricas (ROEDIGER, 1980). A provisão de energia extra para estas células é ainda ampliada pela diminuição da oxidação da glicose e dos aminoácidos, usando o butirato como combustível (ROBLES, *et al.*, 2013).

A *M. piperita* utilizada como suplemento alimentar também promoveu melhorias no desempenho zootécnico de algumas espécies de peixes (TALPUR, 2014; ADEL *et al.*, 2015). A suplementação com 3% de *M. piperita* para juvenis de *Rutilus frisii kutum* promoveu melhores valores de ganhos de peso e de conversão alimentar (ADEL *et al.*, 2015). De modo semelhante, juvenis de *Lates calcarifer* alimentados por 30 dias com suplementação dietética de 2 a 5% de *M. piperita*, apresentaram melhores valores de crescimento, ganho de peso e conversão alimentar (TALPUR, 2014). No presente estudo a suplementação em até 2% com *M. piperita* promoveu uma discreta melhora dos parâmetros avaliados no estudo, porém, não de forma significativa. Possivelmente as larvas de *R. quelen* necessitam de suplementações dietéticas com *M. piperita* maiores que 2% para influenciar na melhoria do desempenho.

Considerando que a *Mentha* sp. atua como um ativador de apetite, aumentando significativamente a ingestão diária de alimentos (NOBAKHT e MEHMANNAVAZ, 2010), é esperado que doses adequadas promovam melhoria do desempenho zootécnico das larvas alimentadas com dieta suplementada com *M. piperita*. Apesar dos juvenis de *Lates calcarifer* alimentados com dieta suplementada com valores entre 2 e 5% de *M. piperita* terem apresentado melhor desempenho zootécnico, somente quando receberam 5% de suplementação com *M. piperita* é que apresentaram aumento de sobrevivência após o desafio com *Vibrio harveyi* (TALPUR, 2014).

A inclusão do óleo essencial de *M. piperita* na dieta propicia uma rápida absorção após a ingestão, causando efeitos positivos no intestino de peixes (ADEL *et al.*, 2015). Esse benefício na morfologia das células intestinais, provendo alteração das dimensões dos vilos e da quantidade de células calciformes, foi apenas discretamente observado em juvenis de *R. quelen* suplementadas com 2% da substância, porém sem diferença significativa em relação ao tratamento controle.

As dietas suplementadas com *M. piperita* têm causado outros efeitos em peixes, tais como uma maior atividade bactericida do muco da pele sobre quatro espécies bacterianas testadas (*Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*) para caspian white (*Rutilus frisii kutum*) (ADEL *et al.*, 2015); ou ainda, a capacidade de aumentar os teores de globulina (ABASALI e MOHAMAD, 2010), um fator primário reconhecido por manter o sistema imunológico saudável e as funções imunes do sangue, fortalecendo assim a imunidade inata (NYA e AUSTIN, 2009a, b), ou mesmo pelo efeito citotóxico da *M. piperita* contra *I. multifiliis* (VALLADÃO *et al.*, 2016).

Considerando a importância do muco da pele dos peixes como uma primeira barreira de defesa contra a infestação do parasito *I. multifiliis*, haja vista que em sua fase teronte penetra na epiderme e epitélio dos peixes, movendo-se entre duas células epiteliais para as camadas epidérmicas subjacentes, passando a residir e se alimentar na epiderme do hospedeiro na fase trofonte (AIHUA e BUCHMANN, 2001). A suplementação da dieta com 2% de *M. piperita* não foi uma barreira eficaz contra a infestação das larvas de *R. quelen* pelo parasito *I. multifiliis*.

Já o butirato de sódio é reconhecido por exercer influência sobre as funções celulares relevantes para a saúde, como a inibição de inflamação, reforçando assim vários componentes de defesa e reduzindo o estresse oxidativo (HAMER *et al.*, 2008). Apesar disso, os juvenis de jundiá não se mostraram mais resistentes à infestação por *I. multifiliis* mesmo quando receberam dieta suplementada com até 0,50% de butirato de sódio, mantendo a mesma intensidade média de infestação e de prevalência dos peixes do tratamento controle. Em todos os tratamentos foram observadas infestações consideradas severas. De acordo com XU *et al.* (2009), a infestação severa é caracterizada pela presença de mais de 100 trofontes por peixes.

## CONCLUSÃO

É recomendada a suplementação dietética de larvas de *R. quelen* com 0,50% de butirato de sódio por 30 dias, pois essa inclusão melhora a condição intestinal e o desempenho zootécnico dos peixes. Apesar disso, a suplementação de até 2% de óleo essencial de *M. piperita*, durante 30 dias, não foi suficiente para alterar a morfologia intestinal e nem o desempenho zootécnico das larvas de *R. quelen*. A infestação dos juvenis de *R. quelen* por *I. multifiliis* não foi afetada pela

suplementação, durante a larvicultura, de até 2% de *M. piperita* ou de até 0,50% de butirato de sódio na dieta, de modo que os peixes suplementados não se mostraram mais resistentes à infestação pelo parasito. Essas descobertas podem ter importante implicação na redução da duração do tempo para a produção de juvenis de *R. quelen* e devem ser levadas adiante com novos estudos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental pelo fornecimento do óleo essencial de *Mentha piperita*. Ao Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da Universidade Federal de Santa Catarina pela cessão da infraestrutura necessária para as análises histológicas. Ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade a EZF.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, G.; LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. 2014b Possibilities to control *Ichthyophthirius multifiliis* infestation with medicated feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Parasitology Research*, 113(3): 1119–1126. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3749-9>.
- ABASALI, H.; MOHAMAD, S. 2010 Immune response of common Carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(13): 1839–1847. <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2010.1839.1847>
- ADEL, M.; AMIRI, A.A.; ZORRIEZHARA, J.; NEMATOLAH, A.; ESTEBAN, M.A. 2015 Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2): 841–847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.010>
- AIUHA, L.; BUCHMANN, K. 2001. Temperature and salinity dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. *Journal of Applied Ichthyology*, 17(6): 273–276. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00279.x>

- ANDRADE, J.I.A.; JERÔNIMO, G.T.; BRASIL, E.M.; NUNEZ, C.V.; GONÇALVES, E.L.T.; RUIZ, M.L.; MARTINS, M.L. 2016 Efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasites and physiological aspects of *Colossoma macropomum* after bath treatment. *Aquaculture*, 462(1): 40-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.024>
- ATENCIO-GARCIA, J.V.; ZANIBONI-FILHO, E.; PARDO-CARRASCO S.; ARIAS-CASTELLANOS A. 2003 Influencia da primeira alimentação na larvicultura e alevinagem do yamú *Brycon siebenthalae* (characidae). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 25(1): 61-72. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v25i1.2092>
- BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L.V.F. 2004 Qualidade da água. In: BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. (Eds.) Criação de jundiá. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p.73-92.
- BALDISSEROTTO, B. 2009 Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, 39(1): 291-299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008005000046>
- BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C.V.; DALGAARD, M. 2001. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 100(1): 105-116. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00487-3)
- DAIKIRI, J.K.; MAJOLO, C.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; DE OLIVEIRA, M.R.; DE MORAES, I. S. 2013 Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes. *Circular técnica* 42. Embrapa-AM, 8p.
- DEFOIRD, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. 2009 Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27(6): 680 - 685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.026>
- FARMER, B.D.; FULLER, S.A.; MITCHELL, A.J.; STRAUS, D.L.; BULLARD, S.A. 2013 Efficacy of Bath Treatments of Formalin and Copper Sulfate on Cultured White Bass, *Morone chrysops*, Concurrently Infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of World Aquaculture Society*, 44(2): 305-310. <https://doi.org/10.1111/jwas.12027>
- GABRIEL, N.N.; QIANG, J.; HE, J.; MA, X.Y.; KPUNDEH, M.D.; XU, P. 2015 Dietary *Aloe vera* supplementation on growth

- performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2): 504-514. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>
- GALFI, P.; BOKORI, J. 1990 Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Veterinaria Hungarica*, 38(1-2): 3-17.
- GOLTERMAN, H.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. 1978 Methods for physical and chemical analysis of fresh water. Black well Scientific Publications Ltd. Oxford, 213p.
- GUILLOTEAU, P.; MARTIN, L.; EECKHAUT, V.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, R.; VAN IMMERSEEL, F. 2010 From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23(2): 366-384. <https://doi-org.ez9.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S0954422410000247>
- HAMER, H. M; JONKERS, D; VENEMA, K; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. 2008 Review Article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2): 104-119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>
- HASHIMOTO, G.S.O.; NETO, F.M.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. 2016 Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450: 182-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. 2007 Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73(6): 1309 - 1317. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01469.x>
- ISCAN, G.; DEMIRCI, F.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K.H.C. 2002 Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50(14): 3943-3946. <https://doi.org/10.1021/jf011476k>
- KOROLEFF, F. 1975 Metodologia para Determinação da Amônia. Methods of seawater analysis. In: K GRASSHOFF. Verlag.Chemie. Weinheim, New York p.117-181.
- TIAN L.; ZHOU X.; JIANG W.; LIU Y.; WU P.; JIANG J.; KUANG S.; TANG L.; TANG W.; ZHANG Y.; XIE F.; FENG L. 2017 Sodium butyrate improved intestinal immune function associated

- with NF- $\kappa$ B and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66: 548-563. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.049>
- LIU, W.; YANG, Y.; ZHANG, J.; GATLIN, D.M.; RINGO, E.; ZHOU, Z. 2014 Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British Journal of Nutrition*, 112(1): 15–29. <https://doi.org.ez9.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S0007114514000610>
- MALHEIROS, D.F.; MACIEL, P.O.; VIDEIRA, M.N.; TAVARES-DIAS, M. 2016 Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (Pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455: 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>
- MORAIS, S.R.; OLIVEIRA, T.L.S.; BARA, M.T.F.; CONCEIÇÃO, E.C.; REZENDE, M.H.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. 2012 Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012: 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/363919>.
- NOBAKHT, A.; MEHMANNVAZ, Y. 2010 Investigation the effects of using of *Thymus vulgaris*, *Lamiaceae menthapiperita*, *Oreganum vulgare* medicinal plants on performance, egg quality, blood and immunity parameters of laying hens. *Iranian Journal of Animal Science*, 41: 129–136.
- NYA, E.J.; AUSTIN, B. 2009a Use of garlic, *Allium sativum* to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 32(11): 963–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01100.x>
- NYA, E.J.; AUSTIN, B. 2009b Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 32(11): 971–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01101.x>
- OSMAN, H.A.M.; EL-BANA, L.F.; NOOR EL DEEN, A.E.; ABD EL-HADY, O.K. 2009 Investigations on white spots disease (Ichthyophthiriasis) in catfish (*Clarias gariepinus*) with special reference to the immune response. *Global Veterinaria*, 3(2): 113–119.

- RICO, A.; VAN DEN BRINK, P.J. 2014 Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Science of the Total Environment* 468-469: 630–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.063>
- RINTAMÄKI-KINNUNEN, P.; RAHKONEN, M.; MANNERMAA-KERÄNEN, A.L.; SUOMALAINEN, L.R.; MYKRÄ, H.; VALTONEN, E.T. 2005 Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1): 69–76. <https://doi.org/10.3354/dao064069>
- ROBLES, R.; LOZANO, A.B.; SEVILLA, A.; MÁRQUEZ, L.; NUEZ-ORTÍN, W.; MOYANO, F.J. 2013 Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(6):1567–1580. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9809-3>
- ROEDIGER, W.E. 1980 The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *The Lancet*, 316(8197): 712–715. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)91934-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)91934-0)
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A.R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. 2008 Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International*, 34(8): 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.009>
- SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. 2004 Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 66(3): 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>
- TALPUR, A.D. 2014 *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 421-421: 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.039>
- VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. 2015 Phytotherapy as an alternative for treatment of fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(5): 417–428. <https://doi.org/10.1111/jvp.12202>
- VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; IKEFUTI, C.V.; DA CRUZ, C.; LEVY-PEREIRA, N.; RODRIGUES, M.V.N.; PILARSKI, F. 2016 Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on

- treatment with *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Fish Diseases*, 39(10): 1143-1152. <https://doi.org/10.1111/jfd.12447>
- XU, D.H.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. 2009 Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on sérum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4): 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.015>
- ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. 2003 Migratory Fishes of the Uruguai River. In: CAROLSFIELD, J. et al. (Eds.) *Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status*. Victoria: World Fisheries Trust/The World Bank/ International Development Research Centre, p. 135-168.
- ZHENG, R.G. 2009. The effect of sodium butyrate on the growth performance and intestinal mucous structure of fresh water fish. Master's thesis. Acessado em Março 15, 2018. <http://www.globethesis.com/?t=>



### 3. CONCLUSÃO

A realização deste estudo demonstrou que o óleo essencial de *Mentha piperita* é um produto com potencial anestésico para o jundiá *Rhamdia quelen*. Doses de 80 mg L<sup>-1</sup> promovem a anestesia profunda em aproximadamente quatro minutos de exposição e a completa recuperação dos peixes em cerca de sete minutos após retorno a água livre do anestésico. De acordo com os critérios para seleção de um agente anestésico eficaz, essas são características seguras e recomendadas para anestesia em peixes. Porém, ele se torna tóxico para juvenis de *Rhamdia quelen* de acordo com a relação tempo/concentração. Esta toxicidade ocorre quando os peixes são expostos por quatro horas em concentrações superiores a 50 mg L<sup>-1</sup>, apresentando CL<sub>50-4h</sub> de 75 mg L<sup>-1</sup>.

As brânquias dos juvenis de *Rhamdia quelen* podem ser consideradas boas indicadoras da toxicidade causada pela exposição prolongada ao óleo essencial de *Mentha piperita*. Concentrações a partir de 20 mg L<sup>-1</sup> provocam lesões nos tecidos branquiais após quatro horas de exposição, tais como: congestão do seio venoso da lamela primária e na base da lamela secundária; hiperplasia interlamelar e com fusão das lamelas; descolamento do epitélio; dilatação do seio venoso; edema justalamelar e aneurisma.

A suplementação dietética de larvas de *R. quelen* com 0,50% de butirato de sódio por 30 dias é recomendada, pois essa inclusão melhora a condição intestinal, com aumento da largura dos vilos e quantidade de células caliciformes, e as taxas de sobrevivência, crescimento e o peso final dos peixes. Apesar disso, a suplementação de até 2% de óleo essencial de *M. piperita*, durante 30 dias, não foi suficiente para alterar a morfologia intestinal e nem o desempenho zootécnico das larvas de *R. quelen*.

A infestação dos juvenis de *R. quelen* por *I. multifiliis* não foi afetada pela suplementação, durante a larvicultura, de até 2% de *M. piperita* ou de até 0,50% de butirato de sódio na dieta, de modo que os peixes suplementados não se mostraram mais resistentes à infestação pelo parasito.

Essas descobertas podem ter importante implicação na redução da duração do tempo para a produção de juvenis de *R. quelen* e devem ser levadas adiante com novos estudos que busquem encontrar a concentração ótima de inclusão desses aditivos alimentares.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, G.; LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. Possibilities to control *Ichthyophthirius multifiliis* infestation with medicated feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and chub (*Leuciscus cephalus*). **Parasitology Research**, v.113, n.3, p.1119–1126, 2014b. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3749-9>.
- ADEL, M.; AMIRI, A.A.; ZORRIEHZAHRA, J.; NEMATOLAH, A.; ESTEBAN M. A. Effects of dietary peppermint (*Menthapiperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilusfrisiikutum*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.2, p.841-847, 2015.
- ADIL, S.; BANDAY, T.; BHAT, G.A.; MIR, M.S.; REHMAN, M. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, v.10, p.4061–4067, 2010.
- AKDOĞAN, M.; TAMER, M.N.; CÜRE, E.; CÜRE, M.C.; KÖROĞLU, B.K.; DELİBAŞ, N. Effect of spearmint (*MenthaspicataLabiatae*) teas on androgen levels in women with Hirsutism. **Phytotherapy Research**, n.21, p.444–447, 2007.
- ANDRADE, J.I.A.; JERÔNIMO, G.T.; BRASIL, E.M.; NUNEZ, C.V.; GONÇALVES, E.L.T.; RUIZ, M.L.; MARTINS, M.L. Efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasites and physiological aspects of *Colossoma macropomum* after bath treatment. **Aquaculture**, v.462, n.1, p.40-46, 2016.
- BADI, H.N.; YAZDANI, D.; ALI, S.M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v.19, p.231–236, 2004.
- BARCELLOS, L.J.G.; WASSERMANN, G.F.; SCOUT, A.P.; WHOEL, V.M.; QUEVEDO, R.M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M.H.; LULHIER, F. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and 38 Gaimard, Pisces Teleostei), during the

first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v.121, p.325-332, 2001.

BENOVIT, S.C; SILVA, L.L; SALBEGO, J; LORO, V.L; MALLMANN, C.A; BALDISSEOTTO, B. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.). Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.3, p.1675–1689, 2015.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, n.2, p.567–590, 1990.

BHATTACHARJEE, S. *Mentha spicata*. **Pointer Publications**, Jaipur, Índia, 1998.

BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; WATHNE, E. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, v.5, n.3, p.181–191, 1999.

BLUMENTHAL, M. **The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines**. (Ed.) *American botanicalcouncil*. Austin, TX. 1998.

BOIJINK, C.L.; MIRANDA, W.S.C.; CHAGAS, E.C.; DAIRIKI, J.K.; INOUE, L.A.K.A. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. **Aquaculture**, v.438, p.138–140, 2015.

BOND, J.H; LEVITT, M.D. Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.57, n.5, p.1158–1164, 1976. doi: 10.1172/jci108383

BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C.V.; DALGAARD, M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, v.100, p.105–116, 2001.

BULFON, C.; VOLPATTI, D.; GALEOTTI, M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. **Aquaculture Research**, v. 46, p.513–551, 2015.

CANANI, R.B.; DI COSTANZO, M.; LEONE, L.; PEDATA, M.; MELI, R.; CALIGNANO, A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterol**, v.17, n.12, p.1519–1528, 2011. doi:10.3748/wjg.v17.i12.1519

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.R.C. Jundiá: um grande peixe para a região sul. **Panorama da Aquicultura**, v.12, p.41-46, 2002.

CCAC (Canadian Council on Animal Care). **Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing**. CCAC, Ottawa, 94p. 2005. Disponível em: [ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf](http://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf). Acesso em: 21 de março 2018

CÉSAR, A.; SILVA, S.L.R.; SANTOS, A.R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição**. Universidade Santa Cecília. Santos, São Paulo, Brasil, 1997.

CHANDROO, K.P.; YUE, S.; MOCCIA, R.D. An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. **Fish and Fisheries**, v.5, p.281–295, 2004.

CLAUDIANO, G.S.; DIAS NETO, J.; SAKABE, R.; CRUZ, C.; SALVADOR, R.; PILARSKI, F.). Efficacy of aqueous extract of “*Terminalia catappa*” in tambaqui juveniles parasitized by monogenean and protozoan. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.3, p.625–636, 2009.

CONAMA. **Concentração Letal Mediana-CL50 ou Concentração Efetiva Mediana-CE50**. Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução N<sup>o</sup> 430, de 13 de maio de 2011, Publicada no DOU n<sup>o</sup> 92, de 16/05/2011, pág. 89.

DEFOIRD T., T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends in biotechnology**, n.25, p.472–479, 2007.

DEFOIRD T., T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates:

(New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v.27, p.680-685, 2009.

DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p.251–258, 2011.

DUBICK, M.A. Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. **The Journal of Nutrition**, n.116, p.1348-1354, 1986.

EKANEM, A.P.; OBIEKEZIE, A.; KLOAS, W.; KNOPF, K. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **The journal Parasitology Research**, v.92, p.361-366, 2004.

FARMER, B.D.; FULLER, S.A.; MITCHELL, A.J.; STRAUS, D.L.; BULLARD, S.A. Efficacy of Bath Treatments of Formalin and Copper Sulfate on Cultured White Bass, *Morone chrysops*, Concurrently Infected by *Onchocleidus mimus* and *Ichthyophthirius multifiliis*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.44, n.2, p.305–310, 2013. <https://doi.org/10.1111/jwas.12027>

FDA/CVM. **Guidance for industry. Concerns related to the use of clove oil as an anesthetic for fish**. Maryland, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 2007. 3p. Disponível em: <http://www.regulations.gov>. Acesso em: 14 de Nov. 2017.

FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S. No rastro das espécies nativas. **Panorama da Aqüicultura**, v.12, p.43-49, 2002.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.26, p.345-352, 2004.

GABRIEL, N.N.; QIANG, J.; HE, J.; MA, X.Y.; KPUNDEH, M.D.; XU, P. Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, n.2, p.504-514, 2015.

GALFI, P.; BOKORI, J. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.38, n.1-2, p.3-17, 1990.

GAO, Y.; STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K.D.; PENN, M.; OVERLAND, M. Supplementation of fishmeal and plant proteinbased diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. **Aquaculture**, v.311, n.1-4, p.233-240, 2011. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.048

GUBBELS-VAN HAL, W.M.; BLAAUBOER, B.J.; BARENTSEN, H.M.; HOITINK, M.A.; MEERTS, I.A.; VAN DER HOEVEN, J.C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.42, n.3, p.284-95, 2005.

GUÉNETTE, S.A.; UHLAND, F.C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmaco kinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, p.262-265, 2007.

HADIAN, J.; GHASEMNEZHAD, M.; RANJBAR, H. Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. **Journal of Essential Oil Research**, n.11, p.553-562, 2008.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.M.A.E.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.A.L.W.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.27, n.2, p.104-119, 2008.

HARDARI, A.; NOBAKHT, A.; SAFAMEHR, A. Investigation the effects using Nettle (*Urtica dioica*), Mentapulagum (*Oreganum vulgare*) and Zizaphora (*Thymus vulgaris*) medicinal plants and there mixtures

on biochemical and immunity parameters of broilers. **Proc. 4th Iran. Cong. Anim. Sci**, p. 214–217, 2010.

HASHIMOTO, G.S.O.; NETO, F.M.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v.450, p.182–186, 2016.

HINES, R.S.; SPIRA D.T. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio* L. I. Course of infection. **Journal of Fish Biology**, v.5, p.385–392, 1973.

HOSEINI, S.M. Efficacy of clove powder solution on stress mitigation in juvenile common carps, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Comparative Clinical Pathology**, v.20, p.359–362, 2011.

HOSEINI, S.M.; GHELICHPOUR, M. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.38, p.493–498, 2012.

HOSEINI, S.M; NODEH, A. Changes in blood biochemistry of common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus), following exposure to different concentrations of clove solution. **Comparative Clinical Pathology**, v.22, p.9–13, 2013.

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

HOSEINI, S.M.; MIRGHAED, A.T.; YOUSEFI, M. Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.0, p.1–15, 2018.

HOSEINIFAR, S.H.; SUN, Y.Z.; CAIPANG, C.M. Short chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: na updated view. **Aquaculture Research**, v.48, n.4, p.1380-1391, 2016a. doi:10.1111/are.13239

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v.73, p.1309-1317, 2007.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, v.44, p.51, 2017.

INOUE, L.A.K.A.; SANTOS-NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.943-947, 2003.

ISCAN, G.; DEMIRCI, F.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K.H.C. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.50, p.3943-3946, 2002.

JAMSHIDI, R.; AFZALI, Z.; AFZALI, D. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.5, p.78–81, 2009.

KEENE, J.; NOAKES, D.; MOCCIA, R.; SOTO, C. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89–101, 1998.

KEIFER, M.D.D.; ULBRICHT, C.; RAE ABRAMS, P.T.; ETHAN BASCH, P.D.; GIESE, M.D.N.; GILES, M.S.M. Peppermint (*Mentha piperita*): an evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration, **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, n.7, p.91-143, 2007.

KIHARA, M.; SAKATA, T. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.118, n.4, p.1201–1207, 1997. doi: 10.1016/s0300-9629(97)00052-2

KIHARA, M.; SAKATA, T. Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch

culture. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v.171, n.6, p.441–447, 2001.

KOTUNIA, A.; WOLINSKI, J.; LAUBITZ, D.; JURKOWSKA, M.; ROME, V.; GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R. Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed correction of feed by artificial sow. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.55, n.2, p.59–68, 2004.

LING, F.; WANG, J.G.; LIU, Q.F.; LI, M.; YE, L.T.; GONG, X.N. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.212–216, 2010.

LING, F.; LU, C.; TU, X.; YI, Y.; HUANG, A.; ZHANG, Q.; WANG, G. Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. **Parasitology Research**, v.112, p.2331–2340, 2013.

LÜCKSTÄDT, C. Use of organic acids as feed additives sustainable aquaculture production the non-antibiotic way. **International Aquafeed**, v.9, n.2, p.21–26, 2006.

LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. **Nutrition and Natural Resources**, v.3, p.1–8, 2008.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **The Journal of Ethnopharmacology**. v.19, p.325–327, 2008.

MAKI, J.L.; BROWN, C.C.; DICKERSON, H.W. Occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* within the peritoneal cavities of infected channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Diseases of aquatic organisms**, v.26, p.41–45, 2001.

MALHEIROS, D.F.; MACIEL, P.O.; VIDEIRA, M.N, TAVARES-DIAS, M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (Pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). **Aquaculture**, v.455, p.81–86, 2016.

MARCHIORO, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy&Gaimard 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v.29, p.315-318, 1999.

MAZANDARANI, M.; HOSEINI, S.M.; DEGHANI GHOMSHANI, M. Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation. **Aquaculture Research**, v.48, p.5775–5781, 2017.

MAZANDARANI, M.; HOSEINI, S.M. Anesthesia of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*; Borodin 1897, by peppermint, *Mentha piperita*, extract—Anesthetic efficacy, stress response and behavior. **International Journal of Aquatic Biology**, v.5, p.393–400, 2018.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, v.69, p.413–419, 2003.

MCKAY, D.L.; BLUMBERG, J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, v.20, p.619-633, 2006.

MORKEN, T.; KRAUGERUD, O.F.; BARROWS, F.T.; SORENSEN, M.; STOREBAKKEN, T.; OVERLAND, M. Sodium diformate and extrusion temperature affects nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.317, p.138–145, 2011.

NAYLOR, R.L.; HARDY, R.W.; BUREAUC, D.P.; CHIU, A.; ELLIOTT, M.; FARRELLE, A.P.; FORSTERE, I.; GATLIN, D.M.; GOLDBURG, R.J.; HUA, K.; NICHOLS, P.D. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, p.15103–15110, 2009.

NG, W.K.; KOH, C.B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v.9, n.4, p.342-368, 2016. doi:10.1111/raq.12141

NIGRELLI, R.F.; POKORNY, K.S.; RUGGIERI, G.D. Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a ciliate parasitic on freshwater fishes, with

some remarks on possible physiological races and species. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.95, p.607–613, 1976.

NOBAKHT, A.; MEHMANNAVAZ, Y. Investigation the effects of using of *Thymus vulgaris*, Lamiaceae *Mentha piperita*, *Oreganum vulgare* medicinal plants on performance, eggquality, blood and immunity parameters of laying hens. **Iranian Journal of Animal Science**, v.41, p.129–136, 2010.

NTP. **Carcinogenesis studies of eugenol**: Relatório do ano de 1983. North Carolina, National Toxicology Program, 1983. 165p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 14 de nov. 2017.

NUEZ-ORTIN, W.G. Gustor-aqua: an effective solution to optimize health status and nutrient utilization. **International Aquafeed**, p.18–20, 2011.

NUEZ-ORTIN, W.G. **Antimicrobial properties of Gustor B92 against pathogenic bacteria of freshwater fish and marine shrimp**. In: Conference proceedings world aquaculture society 2011, Natal, Brazil.

NUEZ-ORTIN, W.G. **Antimicrobial properties of butyric acid and other organic acids against pathogenic bacteria affecting the main aquatic species**. In: Conference proceedings aqua conference 2012, Prague, Czech Republic.

OSMAN, H.A.M.; EL-BANA, L.F.; NOOR EL DEEN, A.E.; ABD EL-HADY, O.K. Investigations on white spots disease (Ichthyophthiriasis) in catfish (*Clarias gariepinus*) with special reference to the immune response. **Global Veterinaria**, v.3, p.113– 119, 2009.

OWEN, M.A.G.; WAINES, P.; BRADLEY, G.; DAVIES, S. **The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822)**. XII international symposium fish nutrition and feeding, 2006.

PAPERNA, I. Infection by *Ichthyophthirius multifiliis* of fish in Uganda. **Progressive Fish-Culturist**, v.34, p.162–164, 1972.

PARK, I.S.; JO, J.H.; LEE, S.J.; KIM, Y.A.; PARK, K.E.; HUR, J.W.; YOO, J.S.; SONG, Y.C. Anaesthetic effect of lidocaine hydrochloride–sodium bicarbonate and MS-222 on the greenling (*Hexagram mosotakii*). **Journal of the Korean Fisheries Society**, v.36, p.449-453, 2003.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, n. 1, p. 172-189, 2002.

RAKOVER, Y.; BEN-ARYE, E.; GOLDSTEIN, L.H. The treatment of respiratory ailments with essential oils of some aromatic medicinal plants. **Harefuah**, v.147, p.783-788, 2008.

REVERTER, M.; BONTEMPS, N.; LECCHINI, D.; BANAIGS, B.; SASAL, P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v.433, p.50-61, 2014.

RICO, A.; VAN DEN BRINK, P.J. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. **Science of the Total Environment**, v.468-469, p. 630–641, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.063>

RINTAMÄKI-KINNUNEN, P.; RAHKONEN, M.; MANNERMAA-KERÄNEN, A.L.; SUOMALAINEN, L.R.; MYKRÄ, H.; VALTONEN, E.T. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.64, n.1, p.69–76, 2005. <https://doi.org/10.3354/dao064069>

ROBERTS, R.J. **Fish Pathology**. Wiley & Sons, 2012. 590 p.

ROBLES, R.; LOZANO, A.B.; SEVILLA, A.; MÁRQUEZ, L.; NÚEZ-ORTÍN, W.; MOYANO, F.J. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.39, p.1567–1580, 2013.

ROSE, J.D. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, p.1–38, 2002.

ROSE, J.D. Comment on “Do fish have nociceptors: evidence for the evolution of a vertebrate sensory system,” by Sneddon, Braithwaite, and Gentle. Pages 49–51 2003. In: H. E. Erickson, editor. **Information resources on fish welfare**, 1970–2003. U.S. Department of Agriculture, Animal Welfare Information Resources 20, Beltsville, Maryland.

ROUBACH, R; GOMES, L.C; LEÃO FONSECA, F.A.; VAL, A.L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, p.1056–1061, 2005.

SALBEGO, J; BECKER, A.G.; PARODI, T.V.; ZEPPENFELD, C.C.; GONÇALVES, J.F.; LORO, V.L.; MORSH, V.M.M.; SCHETINGER, M.R.C.; MALDANER, G.; MOREL, A.F.; BALDISSEROTO, B. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.437, p.46–50, 2015.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A.R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, n.8, p.1215–1226, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.009>

SARAIVA, A.; JOANA COSTA, J.; SERRÃO, J.; EIRAS, J.C.; CRUZ, C. Study of the gill health status of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) using different tools. **Aquaculture**, v.441, p.16–20, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.004>

SARKER, M.S.A.; SATOH, S.; KAMATA, K.; HAGA, Y.; YAMAMOTO, Y. Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. **Aquaculture Nutrition**, v.18, p.81–8, 2012a.

SARKER, M.S.A.; SATOH, S.; KAMATA, K.; HAGA, Y.; YAMAMOTO, Y. Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. **Aquaculture Research**, v.43, p.538–545, 2012b.

SHOEMAKER, C.A.; MARTINS, M.L.; XU, D.H.; KLESIUS, P.H. Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* parasitism on the survival, hematology and bacterial load in channel catfish previously exposed to *Edwardsiella ictaluri*. **Parasitology Research**, v.111, p.2223–2228, 2012.

SCHOETTGER, R.A.; STEUCKE, E.W. Jr. Synergic mixtures of MS-222 and quinaldine as anesthetics for rainbow trout and northern pike. **The Progressive Fish-Culturist**, v.32, p.202–205, 1970.

SILVA, B.C.; VIEIRA, F.D.N.; MOURIÑO, J.L.P.; FERREIRA, G.S.; SEIFFERT, W.Q. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v.384–387, p.104–110, 2013a.

SILVA, B.C.; VIEIRA, F.N.; MOURIÑO, J.L.P.; BOLIVAR, N.; SEIFFERT, W.Q. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v.47, p.612–623, 2016.

SILVA, L.L.; PARODI, T.V; RECKZIEGEL, P; GARCIA, V.O; BURGER, M.E; BALDISSEROTTO, B; MALLMANN, C.A; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.350, p.91-97, 2012.

SILVA, L.L.; SILVA, D.T.; GARLET, Q.I.; CUNHA, M.A.; MALLMANN, C.A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S.J.; PEREIRA, A.M.S.; HEINZMANN, B.M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v.11, p.443–451. 2013.

SNEDDON, L.U. Ethics and welfare: pain perception in fish. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.26, p.6–10, 2006.

SOARES, B.V.; NEVES, L.R.; OLIVEIRA, M.S.B.; CHAVES, F.C.M.; DIAS, M.K.R.; CHAGAS, E.C.; TAVARES- DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v.452, p.107–114, 2016.

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v.66, n.3, p.319–329. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>

SUBASINGHE, R. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: the issues, prospects and challenges. **Options Méditerranéennes**. v.86, p.5–11, 2009.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.; SCHRECK, C.; MOYLE, P. Anesthesia, surgery, and related techniques. *Methods for Fish Biology*. **American Fisheries Society**, v.8, n.2, p.213-272, 1990.

TANCREDO, K.R. Imunização com *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): efeitos na sobrevivência, resposta hemato-imunológica, bioquímica e histopatológica. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, 2015, 85p.

TONDOLO, J.S.M.; AMARAL, L.P.; SIMOES, L.N.; GARLET, Q.I.; SCHINDLER, B.; OLIVEIRA, T.M.; da SILVA, T.M.; GOMES, L.C.; BALDISSEROTO, B.; MALLMAN, C.A.; HEINZMANN, B.M. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Neotropical Ichthyology**, v.11, p.667–674, 2013.

TORT, L.; ROTLLANT, J.; PAVLIDIS, M.; MONTERO, D.; TEROVA, G. **The response to stressors in the sea bass**. In: Sánchez Vásquez, F.J., Muñoz-Cueto, J.A. (Eds.), *Biology of European Sea Bass*. CRC Press, NW, p.374–400, 2014.

TRUSHENSKI, J.T.; BOWKER, J.D.; COOKE, S.J.; ERDAHL, D.; BELL, T.; MACMILLAN, J.R.; YANONG, R.P.; HILL, J.E.; FABRIZIO, M.C.; GARVEY, J.E.; SHARON, S. Issues regarding the use of sedatives in fisheries and the need for immediate-release options. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.142, n.1, p.156-170, 2013.

TALPUR, A.D. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v.421, p.71-78, 2014.

TRAXLER, G.S.; RICHARD, J.; MCDONALD, T.E. *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) epizootics in spawning sockeye salmon in British Columbia, Canada. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p.143–51, 1998.

TUNG, Y.T.; CHUA, M.T.; WANG, S.Y., CHANG, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v.99, p.3908-3913, 2008.

UFR (Use of Fishes in Research) Committee. **Guidelines for the use of fishes in research**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 2004

USPHS (U.S. Public Health Service). **Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, 1986. DC: US Department of Health and Human Services.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL<sub>50</sub>“. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; IKEFUTI, C.V.; DA CRUZ C.; LEVY-PEREIRA, N.; RODRIGUES, M.V.N.; PILARSKI, F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Fish Diseases**, p. 1-10, 2016.

VENTURA, M.T.; PAPERNA, I. Histopathology of *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fishes. **Journal of Fish Biology**, v.27, p.185–203, 1985.

XU, D.H.; PRIDGEON, J.W.; KLESIOUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.101–107, 2012a.

XU, D.H.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIOUS, P.H. *Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. **FEMS Microbiology Letters**, v.329, p.160–167, 2012b.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, M.B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.A. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochem** v.67, p.1249-1255, 2006.

YAO, J.Y.; SHEN, J.Y.; LI, X.L.; XU, Y.; HAU, G.J.; PAN, X.Y.; WANG, G.X.; YIN, W.L. Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Parasitology Research**, v.107, p.1035-1042, 2010.

YU, T.W.; XU, M.; DASHWOOD, R.H. Antimutagenic activity of spearmint. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, p.387-393, 2004.

ZAHL, I.H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O.B.; OLSEN, R.E. Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.36, p.719-730, 2010.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U.H. **Migratory Fishes of the Uruguai River**. In: CAROLSFIELD, J. et al. (Eds.) *Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status*. Victoria: World Fisheries Trust/The World Bank/ International Development Research Centre, p.135-168, 2003.

ZANIBONI-FILHO E.; MEURER, S.; SHIBATTA, O.A.; NUÑER, A. P.O. **Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2004, 128p.

ZHANG, X.B.; JIANG, P.; GONG, N.; HU, X.L.; FEI, D.; XIONG, Z.Q.; XU, L.; XU, T.L. Atypic GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. **Plos One**, v.3, n.10, p.1-11, 2008.

ZHANG, W.H.; JIANG, Y.; ZHU, Q.F.; GAO, F.; DAI, S.F.; CHEN, J.; ZHOU, G.H. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.52, n.3, p.292-301, 2011.

ZHENG, R.G. **The effect of sodium butyrate on the growth performance and intestinal mucous structure of fresh water fish**, 2009. PhD thesis, disponível em: <http://www.globethesis.com/?t=2143360272979206>. Acessado em 5 de abril de 2018.

ZEPPENFELD, C.C.; TONI, C.; BECKER, A.G.; DOS SANTOS MIRON, D.; PARODI, T.V.; HEINZMANN, B.M.; BARCELLOS, L.J.G; KOAKOSKI, G.; da ROSA, J.G.S.; LORO, V.L.; da CUNHA, M. A.; BALDISSERETO, B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v.418, p.101–107, 2014.