



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
AMAZONAS
CAMPUS MANAUS – ZONA LESTE
DEPARTAMENTO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

THIAGO SANTANA MALCHER NETO

**USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA, *Lippia alba*,
COMO SUBSTÂNCIA SEDATIVA PARA JUVENIS DE ARRAIA CURURU,
*Potamotrygon wallacei***

**Manaus – AM
2020**

THIAGO SANTANA MALCHER NETO

**USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA, *Lippia alba*,
COMO SUBSTÂNCIA SEDATIVA PARA JUVENIS DE ARRAIA CURURU,
*Potamotrygon wallacei***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM) como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Edson Francisco do Espírito Santo

**Manaus – AM
2020**



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

M242u

Malcher Neto, Thiago Santana.

Uso de óleo essencial de erva cidreira, *Lippia alba*, como substância sedativa para juvenis de arraia cururu, *Potamotrygon wallacei* / Thiago Santana Malcher Neto. -- Manaus, 2020.

34 f. : 30 cm

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas –
Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Edson Francisco do Espírito Santo

1. Estresse. 2. *Lippia alba*. 3. *Potamotrygon wallacei*. 4. Protocolo. 5. Transporte. I. Espírito Santo, Edson Francisco do. II. Título.

CDD – 636.25084

THIAGO SANTANA MALCHER NETO

**USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA CIDREIRA, *Lippia alba*,
COMO SUBSTÂNCIA SEDATIVA PARA JUVENIS DE ARRAIA CURURU,
*Potamotrygon wallacei***

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado e aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Francisco do Espírito Santo.

Aprovado em 19 de Novembro de 2020.

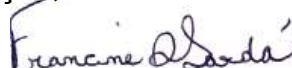
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. EDSON FRANCISCO DO ESPÍRITO SANTO
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)



Prof. MSc. EDUARDO LIMA DE SOUSA
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)



Prof. MSc. FRANCINE DE OLIVEIRA SARDÁ
Escola Superior Batista do Amazonas (ESBAM)

MANAUS - AM

2020

*“Deste-me vida e foste bondoso
para comigo e na tua providência
cuidaste do meu espírito”*

Jó 10:12

AGRADECIMENTOS

Senhor, obrigado por até aqui ter cuidado dos meus dias, remando nesse barco comigo e sempre me levando a praias seguras, obrigado por ter me livrado do tempo ruim e enchido meu coração de esperança e de doçura os meus lábios. Obrigado por ter colocado nas minhas mãos, gestos que demonstram perdão e em meus olhos, a luz que acaricia os meus amados e purifica tudo ao meu redor. Obrigado por toda valentia para lutar, pela compaixão para as injúrias, pela resiliência diante da ingratidão e injustiças. Peço que continue me livrando da inveja, da ambição e suas mesquinhas, do ódio em meu coração e sua conseqüente vingança. E que todos os dias, sempre que encostar minha cabeça em meu leito, eu possa sentir no mais íntimo do meu ser, a tua presença.

Aos meus pais, Paulo e Maria do Carmo por todo carinho e dedicação, pela educação rígida e simples que me preparou para a vida e que com seus gestos de amor e carinho me fizeram ser o homem que sou. Agradeço pelas advertências e pelos momentos de serem meu porto seguro. Agradeço ao meu irmão, Raphael, por todo carinho e confiança depositados em mim, homem que, como meu pai, serve de referência de integridade e decência. À minha tia Bela, que não mediu esforços para trilhar comigo a vida acadêmica.

Ao meu amor, Rebeca, meu raio de sol, que me acolheu nos momentos difíceis desta caminhada, que me incentivou e me deu forças para chegar aqui. Aos meus amigos de jornada, que muito me abraçaram, que fizeram companhia em meio às lágrimas. Nossa união foi a chave para nosso sucesso acadêmico. Aos amigos servidores, que fazem um serviço de excelência.

Agradeço a meu orientador, Professor Doutor Edson, por ter depositado em mim tamanha confiança e dedicação ao longo de todo o curso. E aos professores por todo conhecimento compartilhado. Agradeço ao Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Amazonas por todo o suporte e empenho em minha formação, e a todos os servidores meus eternos votos de gratidão.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, que me recebeu como aluno bolsista e me proporcionou experiências inestimáveis no meio científico. Agradeço ao Prof. Doutor Jaydione Luiz Marcon pela oportunidade dada e por toda orientação ao longo dos 3 anos de trabalho. Agradeço a todos os amigos do Laboratório 11.

A todos os meus eternos votos de gratidão.

RESUMO:

Este estudo utilizou o óleo essencial de *Lippia alba* como sedativo para transporte de arraia juvenis da espécie *Potamotrygon wallacei* (arraia cururu), por um período de 24h. Para estabelecer a concentração ideal, utilizou-se concentrações crescentes de 5, 10 e 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ da substância em duas etapas experimentais. Na primeira avaliou-se o comportamento dos animais expostos, e na seguinte a identificação das possíveis alterações fisiológicas e da morfologia das brânquias. Para a avaliação de comportamento em cada tratamento, seis indivíduos foram acondicionados em sacos abertos individualmente contendo 16L de água providos de aeração constante. Foram avaliadas, em intervalos de quatro horas (0, 4, 8, 12, 16 e 24h), a frequência espiracular, atividade de reflexo e a capacidade de nado de cada animal. A concentração 5 $\mu\text{L.L}^{-1}$ pouco alterou a atividade dos animais, sendo esta descartada para a 2ª etapa. As demais concentrações (10 e 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$) promoveram nos indivíduos, estágios de sedação leve e profunda, respectivamente, sendo que a de 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ causou um óbito nas últimas quatro horas de experimento. Na segunda etapa foram avaliados os parâmetros hematológicos, os metabólitos plasmáticos e eventuais alterações na histologia das brânquias após 24h de exposição. Os parâmetros hematológicos em ambas as concentrações não diferiram do grupo pré-exposição, assim como os metabólitos plasmáticos, com exceção do lactato, que foi significativamente menor na concentração de 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$. Na histologia, as alterações observadas foram semelhantes em ambas concentrações testadas, sendo estas reversíveis, com identificação de discreta hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais e de cloreto. Além disso, não houve óbito nesta etapa. Com isso, pela ausência de mortalidade, coadjuvante ao potencial sedativo e ausência de lesões irreversíveis no aparato branquial dos animais, a concentração de 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ demonstrou ser a mais adequada para o transporte de indivíduos da arraia cururu por períodos de 12 h.

Palavras-chave: Estresse. *Lippia alba*. *Potamotrygon wallacei*. Protocolo. Transporte

ABSTRACT:

This study used the essential oil of *Lippia alba* as a sedative to transport juvenile stingrays of the species *Potamotrygon wallacei* (cururu stingray), for a period of 24h. To establish the ideal concentration, increasing doses of 5, 10 and 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ of the substance were used in two experimental steps. In the first, the behavior of the exposed animals was evaluated, and in the next, the identification of possible physiological changes and gill morphology. For the assessment of behavior in each treatment, six individuals were individually opened open bags containing 1 L of water provided with constant aeration. At four-hour intervals (0, 4, 8, 12, 16 and 24h), the spiracular frequency, reflex activity and swimming capacity of each animal were evaluated. The concentration 5 $\mu\text{L.L}^{-1}$ did little to change the animals' activity, which was discarded for the 2nd stage. The other concentrations (10 and 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$) promoted stages of light and deep sedation in individuals, respectively, with the 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ causing death in the last four hours of the experiment. In the second stage, hematological parameters, plasma metabolites and possible changes in the histology of the gills were evaluated after 24h of exposure. The hematological parameters at both concentrations did not differ from the pre-exposure group, as did the plasma metabolites, with the exception of lactate, which was significantly lower at the concentration of 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$. In histology, the changes observed were similar in both concentrations tested, which are reversible, with identification of mild hyperplasia and hypertrophy of epithelial cells and chloride. In addition, there was no death at this stage. Thus, due to the absence of mortality, in addition to the sedative potential and the absence of irreversible lesions in the animals' gill apparatus, the concentration of 10 $\mu\text{L.L}^{-1}$ proved to be the most suitable for the transport of individuals from the stingray for periods of 24h.

Keywords: Stress. *Lippia alba*. *Potamotrygon wallacei*. Protocol. Transport

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplar de <i>P. wallacei</i>	11
Figura 2. Ambientes explorados pela arraia cururu: ambiente de floresta alagada (igapó), nos meses de cheia (a) e de seca (b) e substrato com deposição de folhiços (c) e fundo arenoso (d) ocupados pela arraia cururu no Rio Negro, Amazonas.	12
Figura 3. Corrosão de borda de disco, setas vermelhas, em indivíduo submetido a procedimento anestésico com óleo essencial de cravo da Índia, Eugenol, na concentração de 200mg.L ⁻¹	14
Figura 4. Coleta de sangue em <i>Potamotrygon wallacei</i>	20
Figura 5. Coleta de brânquias para análise histológica	21
Figura 6. Percentual de juvenis de <i>P. wallacei</i> (n=6 para cada concentração) em diferentes estágios de sedação e anestesia com o óleo essencial de <i>L. alba</i> durante o transcurso de 24 horas de exposição nas concentrações de 5 µL.L ⁻¹ (A); 10 µL.L ⁻¹ , (B) e 15 µL.L ⁻¹ (C).	23
Figura 7. Frequência espiracular dos indivíduos de <i>P. wallacei</i> expostos às diferentes concentrações de <i>L. alba</i>	25
Figura 8. Fotomicrografias de alterações histopatológicas de brânquias de <i>P. wallacei</i> expostas a <i>L. alba</i> . A: hiperplasia das células epiteliais; B: presença de melanomacrófagos; C: hiperplasia das células de cloreto; D: aneurisma lamelar. (*):células de cloreto; (Ce): células epiteliais; (M): melanomacrófagos; (An): aneurisma lamelar. Coloração H-E.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes estágios de anestesia, dos quais a sedação é o primeiro estágio, propostos para espécies de elasmobrânquios marinhos a serem investigados em <i>P. wallacei</i> .	19
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água nas concentrações de 10 e 15µL.L ⁻¹ de <i>L. alba</i> .	26
Tabela 3. Parâmetros sanguíneos de <i>P. wallacei</i> submetidos à diferentes concentrações de <i>L. alba</i> como sedativos (N=3 para cada tratamento).	27
Tabela 4. Análise qualitativa das alterações histopatológicas observadas nas brânquias de juvenis de <i>P. wallacei</i> , expostos à diferentes concentrações de <i>L. alba</i> .	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL.....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	ÁREA DE COLETA DE INDIVÍDUOS DE <i>Potamotrygon wallacei</i>	17
4.2	OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia alba</i>	18
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	18
4.3.1	Avaliação do Comportamento Perante à Exposição.....	18
4.3.2	Avaliação Fisiológica Perante à Exposição	18
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	20
4.4.1	Parâmetros Hematológicos.....	20
4.4.2	Metabólitos Plasmáticos	20
4.4.3	Análises Histológicas.....	21
4.4.4	Análise Estatística.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO PERANTE À EXPOSIÇÃO ...	23
5.2	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	25
5.3	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E METABÓLITOS PLASMÁTICOS.....	26
5.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	27
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A pesca de arraias para fins ornamentais é uma das modalidades predominantes na região do médio Rio Negro, sendo a principal fonte de renda de 10 mil famílias nos últimos anos. Entre os anos de 2002 e 2003, foram comercializadas 25.298 arraias de interesse ornamental (ANJOS et al., 2009; DUNCA et al., 2010).

O grupo de maior interesse comercial pertence à família Potamotrygonidae, e esta é composta por 5 gêneros e 37 espécies descritas. As espécies de maior relevância no comércio de arraias pertencem ao gênero *Potamotrygon*, sendo elas *Potamotrygon wallacei*, *P. orbignyi*, *P. schoederi*, *P. leopoldi*, *P. henlei* (CHARVET-ALMEIDA et al., 2002; CARVALHO et al., 2016).

Conhecida como arraia cururu (Figura 1), *P. wallacei* foi descrita pela primeira vez por Alfred Wallace Russel em uma de suas expedições no Rio Negro, próximo ao município de Barcelos, entre os anos de 1850 e 1852. É uma espécie endêmica na bacia do médio Rio Negro podendo ser encontrada desde o município de Santa Isabel do Rio Negro até o Rio Cueiras, no município de Maués (CARVALHO et al., 2016).



Figura 1. Exemplar de *P. wallacei*. Fonte: Arquivo Pessoal.

Dona de uma beleza única, porte pequeno (31cm de largura máxima de disco), peso de um pouco mais que 1,5kg e possuidora de capacidade e resistência de sobrevivência a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, deram a ela prestígio e interesse comercial no cenário da aquariofilia mundial (CARVALHO et al., 2016; DUNCAN et al., 2016).

Os indivíduos dessa espécie exploram diversos habitats (Figura 2) como florestas inundadas, igarapés, lagos e áreas de praia. São facilmente encontradas

entre folhiços e regiões areno-argilosas, onde os parâmetros físico-químicos da água são caracterizados como ácida (pH entre 4 e 6), pobres em íons e concentração de oxigênio 2 e 4mg.L⁻¹, condutividade elétrica entre 7-20μS.cm⁻¹ e temperatura entre 27 e 30°C (CARVALHO et al., 2016; DUNCAN et al., 2016).

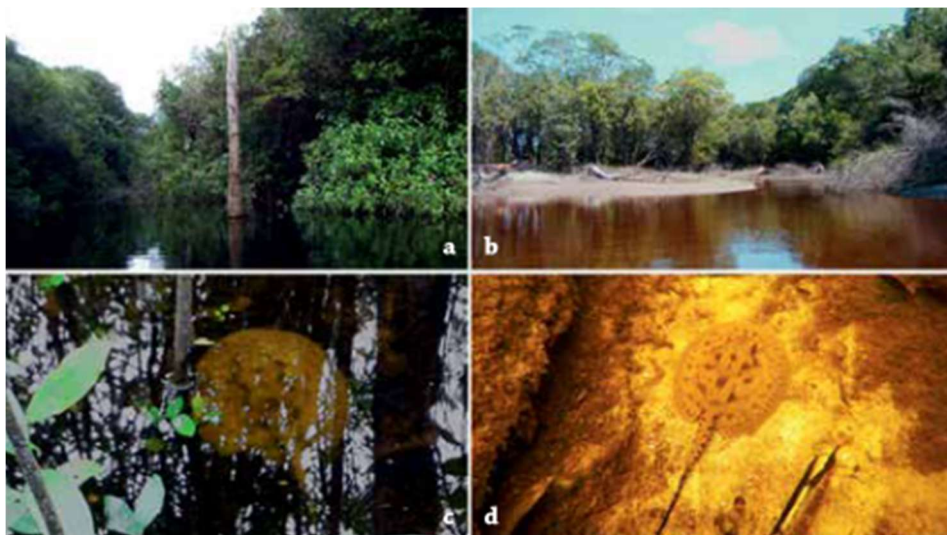


Figura 2. Ambientes explorados pela arraia cururu: ambiente de floresta alagada (igapó), nos meses de cheia (a) e de seca (b) e substrato com deposição de folhiços (c) e fundo arenoso (d) ocupados pela arraia cururu no Rio Negro, Amazonas. Fonte: DUNCAN et al., 2016.

É uma espécie de topo de cadeia alimentar, tendo como principal fonte de nutrientes crustáceos, insetos, moluscos e pequenos peixes. É dotada de ferrão que possui toxinas causadoras de processo inflamatório agudo e extrema dor aguda, conferindo perigo a pescadores e manipuladores (SHIBUYA et al., 2009; CARVALHO et al., 2016).

Devido ao interesse comercial por aquaristas ao redor do mundo, ela está exposta a situações estressoras ao longo do processo de transporte local e exportação (DUNCAN et al., 2016; BRINN et al., 2012).

O prolongamento da percepção de fatores estressantes pode acarretar no comprometimento das funções orgânicas, perda de apetite, acidentes, diminuição do crescimento e em casos extremos na morte do animal (DINIZ e HONORATO, 2012). Neste contexto, as substâncias com propriedades anestésicas e sedativas são de extrema utilidade, quando o objetivo se trata de diminuição dos fatores estressantes em peixes (SOUZA et al., 2019).

A principal via de administração de substâncias anestésicas em peixes é inalatória, sendo através da diluição em água, e devido a isso a principal propriedade procurada nos anestésicos utilizados na aquicultura é a solubilidade em água (MARTINS et al., 2019). Outras vias podem ser utilizadas, como intramuscular, sendo eleitos os medicamentos como cetamina, tiletamina em associação com zolazepam que já foram testadas em espécies de elasmobrânquios marinhos, porém devido aos riscos da contenção física, a preferência é pela via inalatória (MYLNICZENCO et al., 2014; LÉCU et al., 2017).

Dentre os fármacos mais utilizados no Brasil, encontram-se a benzocaína, o fenoxietanol, a quinaldina e a tricaínametanosulfonato (MS-222). As desvantagens na utilização destes produtos estão relacionadas com o custo elevado na obtenção, alterações nos parâmetros físico-químicos da água, ser irritante à mucosa dos peixes, assim como a dos tratadores, podendo acarretar danos irreversíveis às brânquias dos animais, mucosa oral e ocular (ROUBACH et. al, 2001; POSNER et al., 2013).

Com o intuito de diminuir os custos e mitigar os efeitos adversos da utilização de fármacos comumente usados, o uso de fitoterápicos é promissor dentro da aquicultura para controle de estresse (SOUZA et al., 2019). Dentro desse grupo, o óleo essencial de cravo da Índia, *Syzygium aromaticum*, também conhecido comercialmente como Eugenol é amplamente utilizado e há relatos de seu uso em elasmobrânquios em território nacional, como em procedimento anestésico para correção de parto distócico em arraia-ticonha, *Rhinoptera bonasus* (CAVALCANTE et al., 2016).

Esse fármaco, em indivíduos de *P. wallacei*, pode causar lesões como desprendimento de muco e corrosão das bordas do disco, sendo estas relacionadas com a concentração e o tempo de exposição, situação ilustrada na Figura 3 (LIMA, 2018). Há relato de lesão semelhante em arraia viola do focinho curto, *Zapteryx brevirostris*, que quando foi submetida à anestesia com Eugenol, na concentração de 50mg.L⁻¹, teve seus claspers (órgão copulatório semelhante ao pênis dos mamíferos) corroídos (WOSNICK et al., 2017).



Figura 3. Corrosão de borda de disco, setas vermelhas, em indivíduo submetido a procedimento anestésico com óleo essencial de cravo da Índia, Eugenol, na concentração de 200mg.L⁻¹. Fonte: Arquivo Pessoal.

O óleo essencial de erva-cidreira, *Lippia alba*, é outro fitoterápico em emergente uso, tendo como principais características propriedades anti-inflamatórias, sedativas, anti-espasmolíticas e analgésicas (BIASI e COSTA, 2003; SOARES e TAVARES-DIAS et al., 2011). Ele possui como principais componentes carvona, limoneno, germaceno-D e β -mirceno, que atuam sinergicamente sobre o sistema nervoso central e acredita-se que diretamente sobre os receptores GABA (HELDWEIN et al., 2015).

Do ponto de vista econômico, o óleo essencial de *L. alba* já possui registro como anestésico de peixes, o que torna a sua utilização na aquicultura viável e animadora, como alternativa aos produtos sintéticos tradicionalmente utilizados (SILVA et al., 2019). Neste contexto, há relatos do uso do óleo essencial de *L. alba* para atividades rotineiras como manejo e transporte (SILVA et al., 2019).

2 JUSTIFICATIVA

A expansão do mercado da aquicultura intensificou as práticas de cultivo, contribuindo para o aumento de situações estressoras imposta aos peixes (HUSEN et al., 2014). A exposição constante a esses fatores pode acarretar em mudança no metabolismo, perda de apetite, redução do crescimento, emergência de doenças e em casos extremos, morte. Com o intuito de facilitar o manejo, evitar acidentes e reduzir a percepção de fatores estressantes, o uso de substâncias anestésicas se torna indispensável na aquicultura (SOUZA et al., 2019).

A solubilidade em água é uma das características mais importantes nos anestésicos para peixes, devido à facilidade de serem absorvidas pelas brânquias, entretanto, os protocolos devem ser bem estabelecidos de acordo com a espécie, promovendo segurança no alcance dos planos anestésicos almejados (INOUE e MORAES, 2007).

Devido às características já descritas dos anestésicos mais utilizados na aquicultura (MS22, benzocaína, quinaldina e 2-fenoxietanol), o uso de fitoterápicos ganha espaço cada vez mais na rotina da aquicultura pois alia os efeitos na redução da percepção de fatores estressantes e baixa toxicidade ao meio ambiente (SOUZA et al., 2019).

O potencial anestésico do óleo essencial de erva cidreira é conhecido, e por não haver protocolos definidos para a arraia-cururu, fez-se necessário este estudo para definir a concentração sedativa ideal, a fim de garantir o bem-estar, diminuir acidentes, bem como os índices de mortalidade durante o transporte, possibilitando minimizar os prejuízos no comércio regional e internacional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a melhor concentração de óleo essencial de *L. alba* capaz de sedar os indivíduos de *P. wallacei*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar se as diferentes concentrações de *L. alba* (5, 10 e 15 μ L.L⁻¹) sedam os animais;
- Avaliar se as concentrações de 10 e 15 μ L.L⁻¹ do anestésico promovem efeitos sobre parâmetros hematológicos e os níveis de metabólitos plasmáticos;
- Avaliar se o óleo essencial de *L. alba* altera as propriedades físico-químicas da água;
- Avaliar se o óleo essencial de *L. alba* causa alterações irreversíveis no tecido branquial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE COLETA DE INDIVÍDUOS DE *Potamotrygon wallacei*

O presente estudo dispõe de todos os requisitos legais para captura, manipulação e experimentação. A autorização para coleta de material zoológico está sob o registro 18285-1 no Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio), e o registro da aprovação no Comitê de ética no uso de experimentação animal sob o número 002/2017-CEUA/UFAM.

De acordo com a regulamentação do IBAMA (IN N° 204/2008, de 22 de outubro de 2008), o grupo etário de arraias amazônicas preconizado para fins ornamentais e aquariorfilia é de juvenis, sendo esta faixa o alvo de nosso estudo. Eles foram coletados por pesca ativa com auxílio de pescadores profissionais das redondezas da Comunidade do Daraquá, no arquipélago do Mariuá, Município de Barcelos, estado do Amazonas.

As capturas foram realizadas no período da noite, os animais pescados foram mantidos em um acampamento base, constituído de tanques-rede de 1m³ fixado no fundo de areia de igarapé. Após os turnos de pesca, foram direcionados à cidade de Barcelos e acondicionados em caçapas e enviados a Manaus por via fluvial. Ao chegar ao porto do São Raimundo, em Manaus, foram destinados ao Laboratório Experimental de Fisiologia e Comportamento de Animais Aquáticos (LEFCAQ), na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Os animais foram alocados e aclimatados por um período de sete a dez dias em piscinas de plástico de 400L com aeração constante e renovação de água, proveniente de poço artesiano. Durante esse período, parâmetros de qualidade de água como temperatura (°C), pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram mensurados com o uso de um aparelho multiparamétrico *Orion Five Star* (Thermo Inc., EUA).

As arraias eram alimentadas diariamente com minhocas, camarões, peixes até a saciedade dos animais, sendo o alimento fornecido duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde). Após o período de alimentação, a água era gentilmente sifonada para retirada de qualquer resíduo de fezes, muco e alimentos não consumidos. Realizava-se também a troca de 50% da água das piscinas diariamente, e 90% da água duas vezes na semana.

4.2 OBTENÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*

O óleo essencial foi obtido de partes aéreas da planta proveniente de cultivo no Centro de Educação Superior Norte, Campus Frederico Westphalen (UFSM - CESNORS), situado em Santa Maria/RS. O óleo foi obtido por hidrodestilação por clevenger em um período de 3h (TAVARES et al., 2005). O mesmo foi armazenado em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados à -20°C, até o momento da realização dos experimentos.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.3.1 Avaliação do Comportamento Perante à Exposição

Para determinar as concentrações sedativas de *L. alba*, realizou-se um experimento de triagem com seis animais por concentração individualmente alocados em sacos de transporte contendo 16L; estes permaneceram abertos e providos de aeração constante.

Adicionou-se aos sacos as concentrações de 5, 10 e 15 μ L.L⁻¹ e os animais permaneceram imersos por um período de 24h. A cada 4h eram observadas e registradas a capacidade de nado, capacidade de reflexo e frequência espiracular de cada indivíduo e determinado o estágio anestésico (Tabela 1). Nesta etapa, as concentrações que obtiveram melhor desempenho foram de 10 e 15 μ L.L⁻¹.

4.3.2 Avaliação Fisiológica Perante à Exposição

Na segunda parte do experimento, foram utilizadas as duas concentrações de melhor desempenho. Para isso, utilizou-se dois grupos de seis indivíduos e estes foram alocados em sacos plásticos de transporte contendo oxigênio e sedativo, sendo 24h o período de contato. Ao término desse intervalo, os sacos foram abertos para avaliação do comportamento e da mortalidade em cada tratamento. Adicionalmente, no início e no fim do experimento foram mensurados os parâmetros físico-químicos da água. Foi coletado sangue para avaliação de possíveis alterações hematológicas e metabólicas, assim como retirado o segundo arco branquial para estudo histológico.

Tabela 1. Diferentes estágios de anestesia, dos quais a sedação é o primeiro estágio, propostos para espécies de elasmobrânquios marinhos a serem investigados em *P. wallacei*.

Estágio	Descrição	Comportamento do Peixe
0	Normal	Natação ativa, reativos a estímulos externos, movimento respiratório espiracular normal, tônus muscular normal.
1	Sedação Leve	Natação ainda contínua, ligeira perda da reatividade visual e estímulos táteis, ritmo respiratório e tônus muscular normais.
	Sedação Profunda	Parada da natação voluntária, perda total da reatividade visual e da estimulação tátil, ligeira diminuição do ritmo respiratório, e tônus muscular ligeiramente diminuído.
2	Narcolese leve	Fase de excitação, natação errática e descontrolada, perda parcial do tônus muscular, movimentos respiratórios irregulares, reativos apenas a estímulo doloroso, responde à alteração de posição.
	Narcolese profunda	Deixa de responder às mudanças de posição, diminuição do ritmo respiratório, tônus muscular diminuído, reativo a algum estímulo doloroso. Adequado para realização de biópsia.
3	Anestesia Leve	Perda total de tônus muscular; perda total de equilíbrio, diminuição ainda maior da frequência respiratória, apropriado para pequenos procedimentos cirúrgicos.
	Anestesia Profunda	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo, taxa respiratória muito baixa, batimentos cardíacos lentos, perda total de todos os reflexos.
4	Colapso Medular	Parada respiratória, parada cardíaca, morte eventual.

Fonte: Stamper, 2004.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Parâmetros Hematológicos

O sangue foi coletado por meio da artéria branquial com seringas de 3mL banhadas com EDTA (Figura 4). O hematócrito foi determinado pelo método de Goldenfarb et al. (1971). O índice hematimétrico volume corpuscular médio (VCM, fL) foi calculado de acordo com fórmula estabelecida, e a contagem de eritrócitos circulantes (RBC) foi determinada por leitura óptica em câmara de Neubauer em amostras fixadas em formol citrato, na diluição de 1:200 (WINTROBE, 1933).



Figura 4. Coleta de sangue em *P. wallacei*. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.4.2 Metabólitos Plasmáticos

Após a separação do sangue por centrifugação, o plasma foi armazenado em tubos de criogenia em alíquotas e mantidos em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises laboratoriais. Os níveis plasmáticos de glicose (mg.dL^{-1}), proteínas totais (g.dL^{-1}), triglicerídeos (mg.dL^{-1}) colesterol (mg.dL^{-1}) e ureia (mmoles.L^{-1}), assim como os de sódio, potássio, cloreto e lactato, foram determinados por meio da utilização de kits enzimático-colorimétricos (LABTEST, Brasil) específicos para cada metabólito. Estas análises foram realizadas em leitor automático de íons e metabólitos da marca Chemwell (Awareness Technology, Inc. Miami USA), no Laboratório de Atividade Biológica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UFAM, com a colaboração direta do Prof. Dr. Emerson da Silva Lima.

4.4.3 Análises Histológicas

Para a realização das análises histológicas, utilizou-se três amostras de cada concentração, obtidas através da dissecação e extração do segundo arco branquial (Figura 5), sendo estes fixados em formaldeído tamponado à 10%. As amostras foram desidratadas gradativamente em séries alcoólicas (70 a 100%), diafanizadas com xilol e incluídas em parafina a 60°C. Dos blocos obtidos, foram realizados cortes de 4µm, usando micrótomo (Leica RM 2125RT; Leica Microsystems-Wetzlar, Alemanha) e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e montados, para posterior análise e documentação fotográfica, utilizando-se microscópio óptico Leica DM500 com câmera integrada Leica ICC50 W. Estas análises foram conduzidas no Laboratório de Histologia Funcional, do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM, com a colaboração do Professor Dr. Fernando Marques Barcellos. Para a classificação e identificação das alterações histopatológicas, foram seguidas as observações feitas por Vitorovic et al. (1998) e adaptadas para a *P. wallacei*.



Figura 5. Coleta de brânquias para análise histológica. Fonte: Arquivo pessoal

4.4.4 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos em Média \pm DP (desvio padrão). Após esse procedimento, os dados dos parâmetros fisiológicos e de qualidade de água foram testados quanto a sua homocedasticidade, através do teste de Levene e quanto à normalidade pelo Shapiro Wilk. Para os homocedásticos foram utilizados os testes de ANOVA ono-way e Tukey a 5%. Para os dados que se apresentaram heterocedásticos foi utilizado o teste de

Kruskal-Wallis. Por fim, para a comparação entre variáveis com dois tratamentos foi utilizado o Teste t de Student a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO PERANTE À EXPOSIÇÃO

Dentre as concentrações testadas, a $5\mu\text{L.L}^{-1}$, causou um efeito calmante discreto durante as primeiras 4 horas, caracterizado pela discreta diminuição da frequência espiracular (FE), assim como capacidade natatória e de reflexos, porém não o suficiente para caracterizar um patamar de sedação. No decorrer do experimento, os animais permaneceram com a FE diminuída, porém responsivo a estímulos táteis e estabelecida capacidade de nado, como mostra a Figura 6-A.

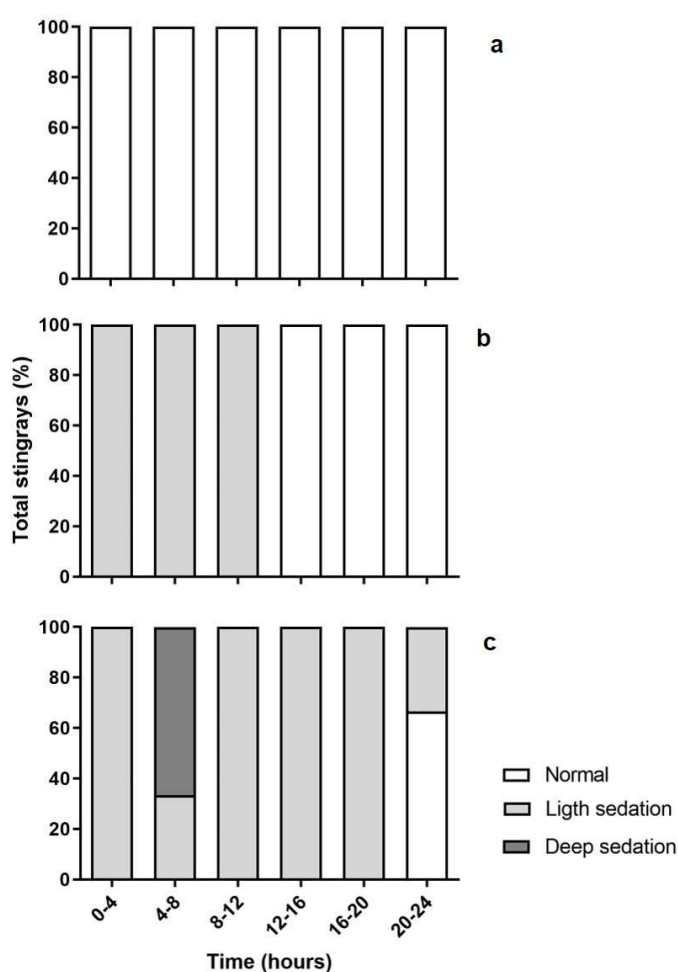


Figura 6. Percentual de juvenis de *P. wallacei* (n=6 para cada concentração) em diferentes estágios de sedação e anestesia com o óleo essencial de *L. alba* durante o transcurso de 24h de exposição nas concentrações de $5\mu\text{L.L}^{-1}$ (A); $10\mu\text{L.L}^{-1}$, (B) e $15\mu\text{L.L}^{-1}$ (C).

Nas primeiras primeiras 12h de experimento, todos os animais do grupo exposto à concentração de $10\mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram diminuição da capacidade de

natatória e de reflexos, caracterizando sedação leve. Após esse período de experimento, observou-se que a manifestação do comportamento de sedação cessou, demonstrando perda do potencial sedativo da concentração testada (Figura 6-B).

Os animais expostos a $15\mu\text{L.L}^{-1}$ de *L. alba* apresentaram o estágio de sedação até as primeiras 20h (Figura 6-C). Durante as primeiras quatro horas, seis animais atingiram o estágio de sedação leve. Em oito horas de experimento, quatro animais apresentaram comportamento compatível com o status de sedação profunda. De 12 a 20h, os seis animais apresentavam-se em sedação leve e ao término, 2 animais ainda apresentavam sinais de sedação leve e três estavam, segundo as avaliações propostas. Nesta concentração houve um óbito, ocorrido nas últimas quatro horas de experimento.

O óleo essencial de *L. alba*, nas concentrações testadas, não foi suficiente para fazer os animais atingirem patamares anestésicos superiores ao estágio de sedação. Apesar de ter havido óbito na concentração de $15\mu\text{L.L}^{-1}$, esta foi a que mais promoveu o estágio de sedação, quando comparado às demais utilizadas por um maior período de tempo

A Figura 7 ilustra o perfil das respostas da FE frente à exposição de juvenis da arraia cururu às três concentrações sedativas de *L. alba*, ao longo de 24h em saco aberto.

Essas respostas nas frequências respiratórias dos grupos experimentais em função da exposição ao óleo essencial de *L. alba* são opostas ao que Becker et al. (2012) identificaram em Jundiás (*Rhamidia quelen*), que mostraram elevação da frequência respiratória. Neste estudo, foi notado a diminuição dos movimentos espiraculares, demonstrando que a substância testada promoveu efeitos sedativos nos indivíduos de *P. wallacei*.

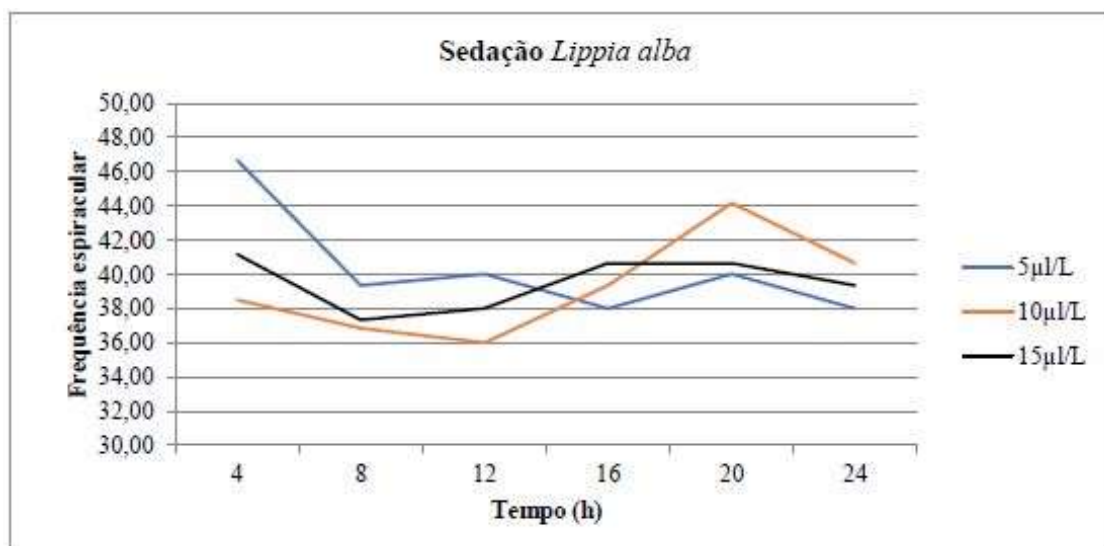


Figura 7. Frequência respiratória dos indivíduos de *P. wallacei* expostos às diferentes concentrações de *L. alba*.

5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Durante a aclimação, assim como no processo experimental, os indivíduos tiveram um ambiente com propriedades físico-químicas da água semelhantes ao ambiente natural segundo Oliveira (2013). Este encontrou os seguintes valores: temperatura $28,03 \pm 0,4$ °C, condutividade $11,99 \pm 0,94 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido $4,04 \pm 0,23 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e pH $4,06 \pm 0,09$.

Todos os parâmetros físico-químicos da água avaliados ao início e ao final do experimento com saco fechado não diferiram significativamente ($p > 0,05$) quando comparados entre si (Tabela 2). O aumento da condutividade elétrica na concentração de $10 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ é explicada pelo acúmulo de matéria orgânica produzida pelos peixes, e o oxigênio pela difusão do oxigênio infundido na unidade experimental antes do início dos trabalhos.

A garantia da qualidade de água semelhante ao encontrado no ambiente natural confere uma menor possibilidade de interferência em outros parâmetros estudados, dando maior confiabilidade aos resultados de parâmetros hematológicos, metabólicos e histológicos.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água nas concentrações de 10 e 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de *L. alba*.

<i>Lippia alba</i> (10$\mu\text{L.L}^{-1}$)				
Tempo	Temperatura °C	Condutividade $\mu\text{S.cm}^{-1}$	Oxigênio mg.L ⁻¹	pH unidade
0 h	25,74 ± 0,09	7,26 ± 0,32	6,72 ± 1,17#	5,70 ± 0,20
24 h	25,60 ± 0,04	16,68 ± 5,72	9,62 ± 1,80	5,68 ± 0,19
<i>Lippia alba</i> (15 $\mu\text{L.L}^{-1}$)				
Tempo	Temperatura °C	Condutividade $\mu\text{S.cm}^{-1}$	Oxigênio mg.L ⁻¹	pH unidade
0 h	25,75 ± 0,48	11,42 ± 3,31	8,45 ± 3,31#	5,78 ± 1,08
24 h	25,45 ± 0,26	11,16 ± 2,09	8,23 ± 2,03	5,69 ± 0,13

Nota: #) indica medida feita antes da injeção de O₂ no saco e fechamento imediato do mesmo.

5.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E METABÓLITOS PLASMÁTICOS

Dentre os parâmetros hematológicos e metabólicos testados nos animais expostos aos protocolos de sedação pelo período de 24h em saco fechado, somente os valores de lactato na concentração de 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de *L. alba* tiveram diferença estatística (Tabela 3).

O lactato pode ser utilizado como parâmetro de estresse em elasmobrânquios, como foi visto por Cicia et al. (2012) que exporaram indivíduos de arraia skate pequeno, *Leucoraja erinacea*, à hipóxia por curtos períodos de tempo ocasionando incremento dos valores deste parâmetro.

Brinn et al. (2012) também não observaram variações nos parâmetros hematológicos em juvenis de arraia cururu submetidos ao estresse de transporte por um período semelhante ao testado no presente estudo. Entretanto, embora não se tenha evidenciado alterações nos parâmetros sanguíneos durante à exposição às concentrações sedativas testadas, estas podem ter causado alterações discretas no “status” fisiológico dos animais, sendo estas não identificadas nos testes.

Tabela 3. Parâmetros sanguíneos de *P. wallacei* submetidos à diferentes concentrações de *L.* como sedativos (N=3 para cada tratamento).

Parâmetro	Controle	<i>Lippia alba</i>	
		10 $\mu\text{L.L}^{-1}$	15 $\mu\text{L.L}^{-1}$
Hematócrito (%)	19,08 \pm 1,70	18,33 \pm 2,80	18,90 \pm 2,7 0
RBC ($10^6.\text{mL}^{-1}$)	0,30 \pm 0,10	0,31 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10
VCM (fL)	582,87 \pm 67,8	511,75 \pm 60,70	476,82 \pm 65,90
Glicose (mg.dL^{-1})	9,47 \pm 1,70	6,00 \pm 2,50	13,03 \pm 7,40
Colesterol total (mg.dL^{-1})	97,93 \pm 28,80	68,77 \pm 46,6	98,60 \pm 38,30
Triglicerídeos (mg.dL^{-1})	43,13 \pm 12,70	46,73 \pm 17,8	72,70 \pm 14,70
Proteínas totais (mg.dL^{-1})	0,60 \pm 0,20	0,90 \pm 0,20	0,92 \pm 0,30
Uréia (mg.dL^{-1})	11,00 \pm 1,50	13,64 \pm 7,40	10,88 \pm 0,40
Lactato (mg.dL^{-1})	5,93 \pm 0,30 ^a	5,57 \pm 2,7 ^a	1,90 \pm 0,50 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as concentrações testadas de *L. alba* (Kruskal-Wallis), em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As alterações encontradas nos animais submetidos às concentrações de 10 e 15 $\mu\text{L.L}^{-1}$ foram semelhantes e estão dispostas na Tabela 4. Os danos evidenciados na histologia branquial são leves e reversíveis, exibindo pouca hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais e de cloreto (Figura 8).

Tabela 4. Análise qualitativa das alterações histopatológicas observadas nas brânquias de juvenis de *P. wallacei*, expostos à diferentes concentrações de *L. alba*.

Alteração	10μL.L⁻¹	15μL.L⁻¹
Hipertrofia do epitélio lamelar	+	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	+	+
Hipertrofia das células de cloreto	+	+
Hiperplasia das células de cloreto	+	+
Fusão lamelar	-	-
Dilatação capilar	+	+
Descolamento epitelial	-	-
Ruptura epitelial (hemorragia)	-	-
Aumento de melanomacrófagos	+	+
Aneurisma Lamelar	+	+
Apoptose das células cloreto	-	-
Necrose	-	-

As alterações decorrentes da exposição ao óleo nas concentrações testadas foram evidentes, entre as tais podem ser citadas a hipertrofia do epitélio lamelar e das células de cloreto. Essas modificações ocorrem como resposta de proteção a agentes tóxicos, a fim de diminuir a absorção pela via respiratória (POSNER et al., 2013).

No presente estudo, identificou-se a presença de melanomacrófagos nas diferentes concentrações testadas. A presença deste tipo celular indica processos inflamatórios e que já foram descritos em uma espécie do gênero *Potamotrygon*, *P. motoro*, em indivíduos expostos a poluentes. Esse achado indica, em baixa proporção, uma irritação em nível branquial, entretanto sendo reversível uma vez cessada a fonte de irritação (AGIUS e ROBERTS, 2003; MANRIQUE et al., 2014; RAMOS-ESPINOZA et al., 2017).

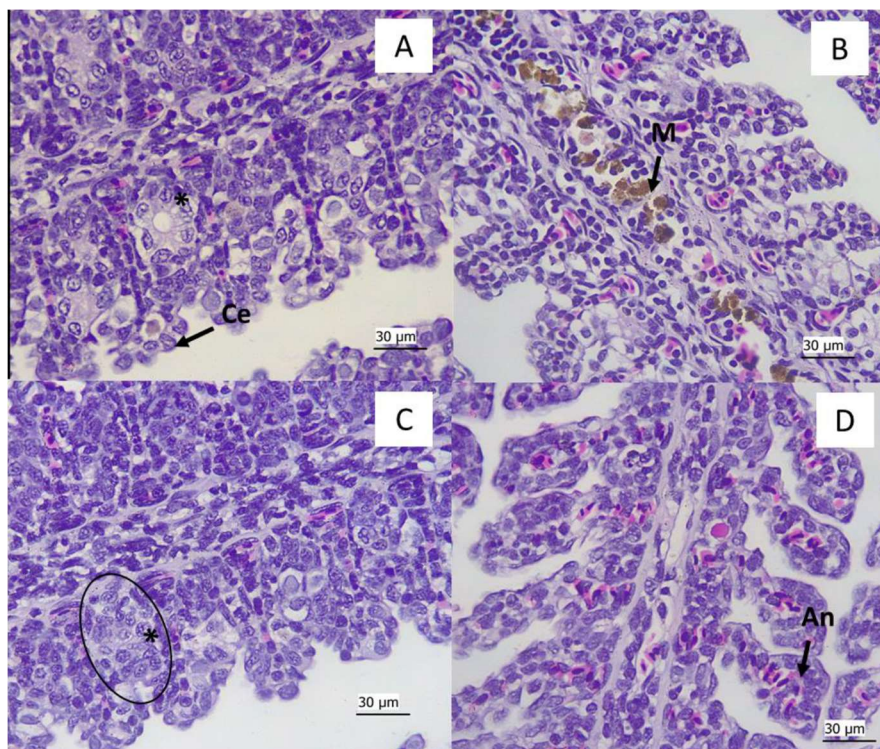


Figura 8. Fotomicrografias de alterações histopatológicas de brânquias de *P. wallacei* expostas a *L. alba*. A: hiperplasia das células epiteliais; B: presença de melanomacrófagos; C: hiperplasia das células de cloreto; D: aneurisma lamelar. (*):células de cloreto; (Ce): células epiteliais; (M): melanomacrófagos; (An): aneurisma lamelar. Coloração H-E.

6 CONCLUSÃO

Dentro das condições deste estudo, e analisando o comportamento diante da exposição, os efeitos nos parâmetros sanguíneos (hematologia e metabólitos plasmáticos) e histologia branquial na concentração de $10\mu\text{L.L}^{-1}$ foi a que promoveu melhores resultados. Tal concentração foi capaz de sedar todos os animais testados por um período de 12h, causou poucas alterações na composição, sendo ausente o registro de mortalidade, e apesar de promover alterações nos tecidos branquiais, ressalta-se que estas foram reversíveis.

Todos estes fatores associados, indicam segurança na utilização do óleo essencial de *L. alba* na prática sedativa para transporte desta espécie de arraia de água doce, garantindo bem-estar durante o transporte comercial, diminuindo os distúrbios de metabolismo e mortalidade.

Vale ressaltar que este estudo foi pioneiro na utilização do óleo essencial de *L. alba* como substância sedativa para juvenis de *P. wallacei*. Dessa forma sugere-se a realização de mais estudos para as outras categorias e outras espécies de arraias amazônicas, em função das especificidades de cada organismo e fornecer subsídios para possíveis comparação entre elas.

REFERÊNCIAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Review: Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 6, p. 499–509, 2003.
- ANJOS, H. D. B.; AMORIM, R. M. S.; SIQUEIRA, J. A.; ANJOS, C. R. Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, bacia Amazônica, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 259-274, 2009.
- BECKER, A. G., T. V. PARODI, C. G. HELDWEIN, C. C. ZEPPENFELD, B. M. HEINZMANN & B. BALDISSEROTTO. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 789-796, 2012.
- BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, p. 455-459, 2003.
- BRINN, R. P.; MARCON, J. L.; MCCOMB, D. M.; GOMES, L. C.; ABREU, J. S.; BALDISSEROTO, B. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 162, n. 2, p. 139–145, 2012.
- CARVALHO, M. R. ROSA, R. S.; ARAÚJO, M. L. G. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon. **Zootaxa**, v. 4107, n. 4, p. 566–86, 2016.
- CAVALCANTE, D. G.; GALLO, H.; SOUSA, O. M.; AZEVEDO, V. G., SANCHES, E. G. Aspectos da reprodução e primeiro registro de distocia em raia ticonha (*Rhinoptera bonasus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 710–718, 2016.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M. L. G.; ROSA, R. S.; RINCON, G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. The International Union for the Conservation of Nature (IUCN). **Shark News**, v. 14, n. 3, p. 1-2, 2002.
- CICIA, A. M.; SHLENKER, L. S.; SULIKOWSKI, J. A.; MANDELMAN, J. W. Seasonal variations in the physiological stress response to discrete bouts of aerial exposure inte

little skate, *Leucoraja erinacea*. **Comparative Biochemistry and physiology**, v. 162, n. 2, p. 132-138, 2012.

CUNHA, M. A.; ZEPPEFELD, C. C.; GARCIA, L. O.; LORO, V.L.; FONSECA, M. B.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. L.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2107-2114, 2011.

DINIZ, N. M; HONORATO, C. A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zootecia**, v 15, n. 2, p. 149-154, 2012.

DUNCAN, W. P.; INOMATA, S. O.; FERNANDES, M. N. Comércio de raias de água doce na região do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 5, n. 2, p. 13–22, 2010.

DUNCAN, W. P.; SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M. L. G.; ZUANON, J. biologia e história natural de *Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) na Bacia do Rio Negro, Amazônia Central, Brasil. In: LASSO, C. A. **XV RAYAS DE (POTAMOTRYGONIDAE) AGUA DULCE DE SURAMÉRICA II**. Ed. 1, Bogotá, Colômbia, p. 289–302, 2016.

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., *et al.* Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.

HELDWEIN, C.; SILVA, L. L.; GAI, E. Z.; ROMANO, C.; PARODI, T. V.; BURGER; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E. M. M.; HEINZMANN, B. S – (+) – Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 6, p. 621-629, 2014

HUSEN, A.; SHARMA, S. Efficacy of anesthetics for reducing stress in fish during aquaculture practices-a review. **Journal of science, Engineering and Technology**, v. 10, p. 104-123, 2014.

INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Óleo de cravo: um anestésico alternativo para o manejo de peixes. **Embrapa Amazônia Ocidental**, p. 22, 2007.

LÉCU, A.; HERBERT, R.; COULIER L.; TIRMARCHE, D.; HÉNARD, S. Anesthetic trials using various species of elasmobranch at Nausicaá Aquarium. In: SMITH, M.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R.; MURRAY, M.; EZURRA, J. **The Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives**. Ed. 1, Ohio, Estados Unidos da América, p. 339-348, 2017.

MARTINS, T.; VALENTIM, A.; PEREIRA, N.; ANTUNES, L. M. Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. **Laboratory Animals**, v. 53, n. 4, p. 325-341, 2019.

MYLNICZENKO, D.N.; CLAUSS, T. M.; STAMPER, M. A. Elasmobranch and Holocephalans. In: West, G.; Heard, D.J.; Caulkett, N.; Blackwell, W. *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. Ed. 2, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, p. 261-302, 2014.

OLIVEIRA, A.T. **Parâmetros hematológicos, aspectos citoquímicos e ultraestruturais das células sanguíneas de três espécies de arraias (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) do Arquipélago de Mariuá, Amazonas, Brasil**. Tese (Doutorado em Diversidade Biológica), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, p. 263, 2013.

OLIVEIRA, A.T.; LEMOS, J.R.G.; SANTOS, M.Q.C.; ARAUJO, M.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. Procedimentos de manuseio e de colheita de sangue em arraias de água doce. **EMBRAPA-Amapá, Série Documentos**, v. 77, 2012.

POSNER, L. P.; SCOTT, G. N.; LAW, J. M. Repetead exposure of goldfish (*Carassius auratus*) to tricaine methanesulfonate (MS-222). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 2, p. 340-347, 2013.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; VAL, A.L. Safest level of tricaine methanosulfanate (MSS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica**, v. 31, p. 159-163, 2001.

SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; ZUANON, J.A.S. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 4, p. 466-475, 2009.

SILVA, H. N. P.; CARVALHO, B. C. F.; MAIA, J. L. S.; BEK CER, A. G.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, L. V. F. Anesthetic potential of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* in Tambaqui juveniles. **Ciência Rural**, v. 49, n. 6, p. 1–6, 2019.

SMALL, B. C. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 238, n. 1–4, p. 469–481, 2004.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109–123, 2013.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN; MARTOS-SITCHA, J. A.; MANCERA, J. M. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 785, p. 1-17, 2019.

STAMPER, M. A. Immobilization of Elasmobranchs. In: SMITH, M. et al. (Ed.). **The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives**. 1. ed. Ohio: Ohio Biological Survey, 2004. p. 281–295.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

VITOROVIC, V. K. S.; TUTUNDZ, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and environmental safety**, v 40, p. 49-55, 1998.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**. v. 51, p. 32-49, 1933.

WOSNICK, N.; RANGEL, B. S.; MOREIRA, R. A.; FREIRE, C. A. Clasper flaring in a guitarfish (*Zapteryx brevirostris* - Elasmobranch, Rinobathidae) under anaesthesia. **Veterinary, Anaesthesia and Analgesia**, v. 44, n. 4, p. 976-978, 2017.