

SENDY MOREIRA REIS

TRANSPORTE DE JUVENIS DE CARPA ORNAMENTAL (KOI), *Cyprinus carpio*:
EFEITO DO ÓLEO DE HORTELÃ E DO TEMPO DE JEJUM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R375t Reis, Sendy Moreira, 1989-
2015 Transporte de juvenis de carpa ornamental(koi), *Cyprinus
carpio* : efeito do óleo de hortelã e do tempo de jejum / Sendy
Moreira Reis. – viçosa, MG, 2015.
xiv, 30f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.27-30.

1. Peixe ornamental - Transporte. 2. *Cyprinus carpio*. 3.
Extratos vegetais. 4. Anestésicos. 5. Stresse (Fisiologia).
6. Stresse oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação
em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.482

SENDY MOREIRA REIS

TRANSPORTE DE JUVENIS DE CARPA ORNAMENTAL (KOI), *Cyprinus carpio*:
EFEITO DO ÓLEO DE HORTELÃ E DO TEMPO DE JEJUM

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

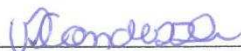
APROVADA: 19 de junho de 2015.



Ana Lúcia Sálaro
(Coorientadora)



Róberson Sakabe



Suellen Silva Condessa



Jener Alexandre Sampaio Zuanon
(Orientador)

Dedico aos meus pais **Rita de Cássia Moreira, Aquino Bernadino Reis e Ilmar Resende de Oliveira.**

Pelo exemplo de honestidade, humildade e força de vontade.

Dedico aos meus irmãos **Helber Moreira dos Reis e Sâmya Gabriela Moreira de Oliveira.**

Pelo carinho, amizade e companhia.

Dedico ao meu orientador, **Jener Alexandre Sampaio Zuanon.**

Pelo exemplo de profissional, pela paciência de sentar ao meu lado, apontar os erros sempre com muito respeito e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por toda educação que venho recebendo desde o ensino médio.

Ao **Departamento de Biologia Animal (DBA-UFV)** pela estrutura disponibilizada e pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudo;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, por fazer parte não só da minha vida profissional, mas também por estar presente na minha vida pessoal com conselhos que foram muito importantes para o meu amadurecimento durante esses anos em que estamos trabalhando juntos. Pela didática que tem em ensinar, que me faz gostar ainda mais do que faço a cada aula que assisto e a cada dúvida que me esclarece. Sou muito grata por tudo e desejo continuar trabalhando com você sempre que possível.

À minha coorientadora **Profa. Dra. Ana Lúcia Salaro** por ter sido tão receptiva e ter me acolhido tão bem no grupo da piscicultura. Por deixar os laboratórios, estrutura e material a total disposição para a realização do meu experimento. Por ter sido fundamental nesse trabalho com ideias e apoio em momentos em que muito precisei. Por se preocupar com o futuro dos seus alunos, preocupar em nos ensinar uma postura adequada diante de um público. Agradeço de coração. Espero sempre poder ir ao seu laboratório te ver, tomar café e conversar.

Ao **Prof. Dr. Sergio Luiz Pinto da Matta** por deixar as portas do Laboratório de Biologia Estrutural – DBG sempre abertas para tudo que preciso. Por me acompanhar ao longo de toda graduação me orientando em duas iniciações científicas. Por estar presente em minha vida desde o ensino fundamental: as caronas, conversas, seu bom humor foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pelo carinho, respeito e por tudo que me ensinou.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado **Jener Alexandre Sampaio Zuanon, Ana Lúcia Salaro, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Fernando Pinheiro Reis**, e aos demais professores responsáveis pela minha formação profissional.

À **Profª Drª Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Células e Ecofisiologia do DBA para as análises de estresse oxidativo.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, **Profª Drª. Ana Lúcia Salaro**, **Prof. Dr Róberson Sakabe** e **Drª Suellen Silva Condessa** e aos suplentes **Prof. Dr. Antônio Policarpo Souza Carneiro** e **Profª Drª. Sirlene Souza Rodrigues Sartori**; agradeço pela disponibilidade, comentários e sugestões.

Aos funcionários do Setor de Piscicultura da UFV, **João Antônio de Oliveira** e **José Francisco Delfino**; Aos funcionários da morfofisiologia **Donizete Aparecido da Silva** e **José Geraldo Alvez**; Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal do Laboratório de Zoologia, **Geraldo Pereira Filho** e à **Emília Wakain de Almeida Costa**. Agradeço por me tratarem sempre com muita educação e mostrarem boa vontade em ajudar em tudo que precisei. Agradeço também por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Biologia Animal **Nilo Souza** e **Lúcia Helena Campos** por estarem dispostos a ajudar sempre que precisei, pelos materiais fornecidos e dúvidas esclarecidas.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal **Adnílson Brasileiro** por me ajudar durante todo o mestrado solucionando minhas dúvidas ajudando nas questões relacionadas às disciplinas, matrículas, sempre com muita paciência.

Ao **Luciano Eliseu Pereira** por doar os peixes para a realização do experimento.

Às doutorandas em Biologia Celular e Estrutural - DBG **Pollyanna de Moraes França Ferreira** e **Lidiane da Silva Nascimento**; ao doutorando em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá **Daniel Abreu Vasconcelos Campelo**; aos Mestres em Biologia Animal **Márcio Yoshiyuki Kanashiro**, **Frederico Werneck Lima**, **Alfredo Rubén Palomino Ramos**; aos pós-graduandos em Biologia Animal - DBA, **Isabel Gertrudes Arrigui de Araújo Neves**, **José Carlos de Oliveira Junior**, **Weliton Becker**, **Willian Chaves**, **Uyara Duarte Vieira**, **Mariana Molica Silveira**, **Magnus Augusto Cossi** e **Renato Barbosa Ferraz**, pela grande amizade, companheirismo e ajuda.

Aos estagiários do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura e estagiários do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal, **Alex Júnio Cardoso, Juliana Rodrigues Gomes, Débora Werneck Caldas, Maria Tatiana Soares, José Francisco Luciano, André Luiz Fialho Ladeira e Cristiana Leonor da Silva Carneiro** pela colaboração durante o experimento e pela amizade;

São amizades que fiz durante o mestrado e que não ficaram restritas a esse trabalho. Sem vocês seria impossível. Gostei muito de trabalhar com todos vocês, cada um com sua característica, o que faz deste, um grupo diverso, divertido e competente. Muito obrigada.

À aluna de doutorado em Biologia Celular e Estrutural - DBG **Jerusa de Oliveira** e demais alunos do Laboratório de Cultura de Células e Ecofisiologia de Quirópteros, pela ajuda nas análises de estresse oxidativo, ajuda na interpretação dos resultados e discussão. Jerusa, agradeço pelo que me ensinou, sempre com muita paciência e bom humor. Você é uma grande profissional.

Agradeço imensamente à minha mãe **Rita de Cássia Moreira** por me obrigar a estudar quando eu ainda não entendia a importância disso para minha vida. Por incentivar e apoiar minhas escolhas. Palavras são pouco para dizer o quanto te agradeço por ser a responsável por eu ter chegado até aqui.

Agradeço ao meu pai **Aquino Bernadino Reis** (in memoriam) por ser o meu anjo da guarda e principalmente por conseguir me provar isso. Por me confortar em situações onde ninguém mais pôde.

Ao meu segundo pai **Ilmar Resende de Oliveira** por estar presente na minha vida, por cuidar de mim e da minha família e por nos fazerem felizes com o seu jeito e carinho.

Ao meu irmão **Helber Moreira dos Reis** por ser o meu melhor amigo. Por me fazer companhia durante toda a vida. “Tamo junto” para sempre Helbim.

À minha irmã **Sâmia Gabriela Moreira de Oliveira** pela amizade e por trazer mais amor, união e alegria para a nossa família.

À minha tia **Rosane Soares Moreira Viana** por ser minha segunda mãe, por tudo que já fez e ainda faz por mim.

Aos meus **avós e demais familiares** por formarem uma família linda, exemplo de convivência e amizade.

Gostaria de agradecer também à **Maria Ferraz** por trazer luz e felicidade aos meus dias. Às **amigas e amigos** pela companhia no dia a dia, pela ajuda, paciência e carinho. Muito obrigada a todos que puderam contribuir de alguma forma durante a minha caminhada até aqui.

À **Deus** por me inspirar a ter fé.

BIOGRAFIA

SENDY MOREIRA REIS nasceu no dia 29 de janeiro de 1989, na cidade de Viçosa em Minas Gerais, Brasil. É filha de Rita de Cássia Moreira e Aquino Bernadino Reis.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Anglo de Viçosa.

Cursou o ensino médio no Colégio de Aplicação COLUNI, na Universidade Federal de Viçosa.

Em 2008 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa e concluiu em 2012.

No ano de 2013, ingressou no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, nível mestrado da Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
ARTIGO	1
1. Introdução	3
2. Material e Métodos	4
2.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para <i>Cyprinus carpio</i> ...	5
2.2. Óleo de hortelã como sedativo em <i>Cyprinus carpio</i> submetidos ao transporte	7
3. Resultados	10
3.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para juvenis de <i>Cyprinus carpio</i>	10
3.2. Óleo de hortelã como sedativo em <i>Cyprinus carpio</i> submetidos ao transporte	
4. Discussão	23
4.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para juvenis de <i>Cyprinus carpio</i>	23
4.2. Óleo de hortelã como sedativo em <i>Cyprinus carpio</i> submetidos ao transporte ...	24
5. Conclusões	26
6. Referências bibliográficas.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do óleo de hortelã pimenta.....	5
Tabela 2. Comportamentos característicos referentes aos estágios de anestesia e recuperação conforme descrito por Woody et. al. (2002).....	6
Tabela 3. Valores médios do tempo necessário para atingir os estágios de indução e recuperação da anestesia em juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.....	12
Tabela 4. Valores médios de glicose sanguínea em juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> submetidos à anestesia em diferentes concentrações de óleo de hortelã.....	12
Tabela 5. Valores médios de taxa de sobrevivência em juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã durante avaliação da segurança do uso do óleo de hortelã como anestésico.....	12
Tabela 6. Valores médios de taxa de sobrevivência de juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> expostos a baixas concentrações de óleo de hortelã durante exposição prolongada (48h)	15
Tabela 7. Valores médios das variáveis de estresse oxidativo logo após o transporte de juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum de 12 e 24 horas antes do transporte.....	17
Tabela 8. Valores médios da glicose sanguínea e taxa de sobrevivência após o transporte de juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum de 12 e 24 horas antes do transporte	18
Tabela 9. Valores médios das variáveis de qualidade de água durante o transporte de juvenis de <i>Cyprinus carpio</i> em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum de 12 e 24 horas antes do transporte.....	19

Tabela 10. Valores médios das variáveis de estresse oxidativo 96 horas após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum21

Tabela 11. Valores médios de glicose sanguínea e taxa de sobrevivência 96 horas após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum22

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Tempos de indução (s) para o estágio 1 (E1) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.....13
- Fig. 2. Tempos de indução (s) para o estágio 2 (E2) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.....13
- Fig. 3. Tempos de indução (s) para o estágio 3 (E3) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.....14
- Fig. 4. Tempos de indução (s) para o estágio 4 (E4) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.....14
- Fig. 5. Tempos de recuperação (s) de anestesia (REC) em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã15

RESUMO

REIS, Sendy Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Transporte de juvenis de carpa ornamental (koi), *Cyprinus carpio*: efeito do óleo de hortelã e do tempo de jejum.** Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadora: Ana Lúcia Salaro.

Durante o processo de criação e comercialização de peixes ornamentais existem muitos fatores que podem causar estresse nos peixes, sendo o transporte um dos principais. O estresse pode prejudicar a saúde e comprometer a sobrevivência dos peixes, podendo causar prejuízos aos produtores. O uso de anestésicos durante os procedimentos de manejo e transporte, bem como o jejum antes do transporte vêm sendo utilizados a fim de minimizar as respostas de estresse dos peixes ornamentais. Dentre os produtos com potencial anestésico em peixes destacam-se os produtos naturais, como os óleos extraídos de plantas. No presente estudo avaliou-se a utilização do óleo de hortelã, extraído da planta *Mentha piperita*, como anestésico para juvenis de carpa ornamental, *Cyprinus carpio*. Para tanto, foram realizados dois experimentos. O primeiro experimento avaliou a eficácia e a segurança do óleo de hortelã como anestésico para *C. carpio* e o segundo experimento avaliou o efeito do óleo de hortelã como sedativo durante o transporte de *C. carpio* submetidos a diferentes tempos de jejum. No primeiro experimento as concentrações testadas foram de 0, 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 175 mg L⁻¹ de óleo de hortelã. Para a escolha das concentrações de óleo de hortelã a serem avaliadas no segundo experimento foi realizado um pré experimento. Foi avaliada a segurança do uso do óleo de hortelã durante exposição prolongada em baixas concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹ de óleo de hortelã). No segundo experimento foram avaliadas três concentrações de óleo de hortelã (0; 15; 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã), dois tempos de jejum (12 h e 24 h) e quatro repetições. O óleo de hortelã mostrou-se eficaz como anestésico para *C. carpio*, sendo recomendadas concentrações entre 50 e 71,41 mg L⁻¹. O óleo de hortelã é seguro como anestésico em concentrações até 150 mg L⁻¹ por 5 minutos e é seguro como sedativo para *C. carpio* em concentrações até 15 mg L⁻¹ por 24 horas. No transporte, o óleo de hortelã não reduziu os danos oxidativos e não aumentou as respostas antioxidantes nas brânquias. Na concentração de 30 mg L⁻¹ o óleo de hortelã causou aumento na mortalidade e nas respostas de estresse dos peixes. Observou-se aumento do produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído e da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase nas brânquias dos peixes submetidos a 24 h de jejum antes do transporte. Assim, conclui-se que o óleo de hortelã é eficaz como anestésico em concentrações acima de 50 mg L⁻¹, porém, não

reduz as respostas de estresse e os danos oxidativos durante o transporte de *C. carpio*. O jejum de 24 h causa maior estresse oxidativo em *C. carpio* quando comparado ao jejum de 12 h.

ABSTRACT

REIS, Sedy Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Transport of juvenile ornamental carp (koi) *Cyprinus carpio*: effect of peppermint oil and fasting time.** Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-adviser: Ana Lúcia Salaro.

During the creating and marketing process of ornamental fish there are many factors that can cause stress on them, and transport is a major factor of ornamental fish. Among the products with anesthetic potential for fish, the natural products, such as oils extracted from plants, are highlighted. In the present study we evaluated the use of peppermint oil, extracted from *Mentha piperita* plant, as an anesthetic for carp juveniles, *Cyprinus carpio*. For this purpose, two experiments were conducted. The first experiment evaluated the efficacy and safety of peppermint oil as an anesthetic for *C. carpio* and the second experiment evaluated the effect of peppermint oil as a sedative during transport of *C. carpio* subjected to different times of fasting. In the first experiment the concentrations tested were 0, 25; 50; 75; 100; 125; 150 and 175 mg L⁻¹ peppermint oil. For the choice of peppermint oil concentrations to be evaluated in the second experiment was carried out a pre experiment. The security of the use of peppermint oil during prolonged exposure at low concentrations was evaluated (10, 20, 30, 40 and 50 mg L⁻¹ of peppermint oil). The second experiment evaluated three peppermint oil concentration (0, 15, 30 mg L⁻¹ of peppermint oil) two times of fasting (12h and 24h) and four replications. The peppermint oil was effective as an anesthetic for *C. carpio*, being recommended concentrations between 50 and 71.41 mg L⁻¹. The peppermint oil is safe as an anesthetic in concentrations up to 150 mg L⁻¹ for 5 minutes and is safe as a sedative for *C. carpio* in concentrations up to 15 mg L⁻¹ for 24 hours. In the transport, the peppermint oil didn't reduce the oxidative damage and also didn't increase the antioxidant responses in the gills. The peppermint oil at 30 mg L⁻¹ increased the fish mortality and stress responses. There was an increase in lipid peroxidation product (malondialdehyde) and in activity of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase in fish gills submitted in 24 hours of fasting prior to transport. Therefore, we concluded that the peppermint oil is effective as an anesthetic in concentrations above 50 mg L⁻¹, but doesn't reduce the stress response and oxidative damage during transport of *C. carpio*. Fasting 24h cause greater oxidative stress in *C. carpio* compared to 12 h fasting.

ARTIGO

**TRANSPORTE DE JUVENIS DE CARPA ORNAMENTAL (KOI), *Cyprinus carpio*:
EFEITO DO ÓLEO DE HORTELÃ E DO TEMPO DE JEJUM**

Artigo redigido com base nas normas do periódico *Aquaculture Research*

Resumo: Para avaliar a eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico e como sedativo durante o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* (10,8 g e 7,0 cm) foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliadas as concentrações de 0, 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 175 mg L⁻¹, com quatro repetições. No segundo experimento foram avaliadas três concentrações de óleo de hortelã (0; 15; 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã) como sedativo durante o transporte, dois tempos de jejum (12 h e 24 h) e quatro repetições. O óleo de hortelã mostrou-se eficaz como anestésico para *C. carpio*, sendo recomendadas concentrações entre 50 e 71,41 mg L⁻¹. O óleo de hortelã é seguro como anestésico em concentrações até 150 mg L⁻¹ por 5 minutos e é seguro como sedativo para *C. carpio* em concentrações até 15 mg L⁻¹ por 24 horas. No transporte, o óleo de hortelã não reduziu os danos oxidativos e não aumentou as respostas antioxidantes nas brânquias. Na concentração de 30 mg L⁻¹ o óleo de hortelã causou aumento na mortalidade e nas respostas de estresse dos peixes. Observou-se aumento do malondialdeído e da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase nas brânquias dos peixes submetidos a 24 h de jejum antes do transporte. Assim, conclui-se que o óleo de hortelã é eficaz como anestésico em concentrações acima de 50 mg L⁻¹, porém, não reduz as respostas de estresse e os danos oxidativos durante o transporte de *C. carpio*. O jejum de 24 h causa maior estresse oxidativo em *C. carpio* quando comparado ao jejum de 12 h.

Palavras-chave: anestesia, estresse, estresse oxidativo, extratos vegetais, peixes ornamentais.

1. Introdução

O processo de criação e comercialização de peixes ornamentais envolve várias etapas de manejo e transporte até que os peixes cheguem aos aquaristas. Os peixes são capturados dos tanques em despescas parciais, passam por classificações por tamanho e permanecem em jejum para limpeza do tubo digestório antes do transporte. Durante o transporte, os mesmos permanecem embalados em sacos plásticos, geralmente em altas densidades (Barcellos et al., 2006; Vidal et al., 2008) por até 96h. Além disso, a qualidade da água tende a diminuir em função do acúmulo de amônia e dióxido de carbono, e da diminuição do oxigênio dissolvido (Dagar et al. 2010; Pan et al. 2010).

Os processos de captura, classificação, manejo de preparação para o transporte e o transporte propriamente dito, bem como as mudanças na qualidade da água decorrente desses manejos, são fatores causadores de estresse nos peixes. O estresse pode provocar aumento da taxa metabólica, distúrbios na regulação osmótica e iônica, alterações hematológicas, prejuízos nas funções do sistema imune (Barton, 2002), aumento nas espécies reativas de oxigênio e ativação dos sistemas antioxidantes (Abele, et al., 2012). Tais efeitos podem prejudicar a saúde dos peixes e comprometer a sobrevivência dos mesmos, afetando os lucros da criação.

Dentre os manejos que contribuem para minimizar as respostas de estresse nos peixes destacam-se o jejum como preparação para o transporte e o uso de anestésicos durante o manejo e transporte (Carvalho et al. 2009; Inoue et al. 2010). O jejum antes do transporte ajuda a diminuir os resíduos fecais na água, contribuindo para a manutenção da qualidade da água por mais tempo. O tempo de jejum varia entre espécies e está relacionado com o tempo de passagem do alimento no tubo digestório. Alguns anestésicos sintéticos são utilizados em peixes, como a triclaína metano sulfonado (MS-222), o fenoxietanol e a benzocaína, porém, esses anestésicos podem causar perda de muco, irritação das brânquias e córneas (Inoue et al., 2003). Além disso, exceto a benzocaína, os demais, são de difícil obtenção e alto custo (Hovda e Linley, 2000). Assim, o uso de produtos naturais, como óleos essenciais extraídos de plantas, têm se mostrado uma alternativa viável para a anestesia em peixes (Cunha, 2007).

Dentre os óleos essenciais com potencial anestésico para peixes destaca-se o óleo de hortelã em função da presença do mentol (Kasai et al., 2014). Esse óleo é extraído das plantas do gênero *Mentha* (*Mentha arvensis* ou *Mentha piperita*) e tem como principais componentes voláteis, além do mentol, o neomentol, isomentol, mentona, 1,8-cineol (eucaliptol), acetato de mentilo, mentofurano, limoneno, β -mirceno, β -cariofileno, pulegona e carvona (Sang, 1982; Pittler and Ernst, 1998; Gherman et al., 2000; Tavish & Harris 2002; McKay e Blumberg,

2006). Esses princípios ativos conferem propriedades ao óleo de hortelã como: antioxidante (McKay e Blumberg, 2006), antiespasmódica, antisséptica, antiviral, anti-inflamatória (Ansari et al., 2000), fungicida, antibacteriana (Burt e Reinders, 2003; Sharma e Jacob, 2000) e carminativa (Berschneider, 2002).

O uso de óleos essenciais como anestésico depende da avaliação de sua eficácia e segurança. Um anestésico é considerado eficaz quando o tempo de indução à anestesia é menor ou igual a 180 segundos e recuperação em até 300 segundos (Marking e Meyer, 1985) e seguro quando não causa mortalidade durante exposição por cinco minutos (Zahl et al., 2009).

Dentre as espécies de água doce, a carpa ornamental (Carpa Koi), uma variedade da carpa comum (*Cyprinus carpio*) destaca-se pela facilidade de criação (Hickling et al., 2007), convivência pacífica com outras espécies, além da grande diversidade de cores, nadadeiras e escamas, com mais de 100 variedades (Kuroki, 1981; Tamadachi, 1990). Essas características e sua comercialização como peixe ornamental em mais de 60 países (FishBase. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em 4 de agosto de 2015) faz com que a carpa ornamental seja uma espécie de grande importância econômica (Gomelsky et al., 1996).

Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram avaliar a eficácia e a segurança do óleo de hortelã como anestésico para *C. carpio* e avaliar o potencial do óleo de hortelã como sedativo durante o transporte de *C. carpio* submetidos a diferentes tempos de jejum.

2. Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos conduzidos no Laboratório de Nutrição de Peixes, do Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, no estado de Minas Gerais, Brasil. O primeiro experimento avaliou a eficácia e a segurança do óleo de hortelã como anestésico para *C. carpio* e o segundo experimento avaliou o efeito do óleo de hortelã como sedativo durante o transporte de *C. carpio* submetidos a diferentes tempos de jejum. Para a escolha das concentrações de óleo de hortelã a serem avaliadas no segundo experimento foi realizado um pré-experimento que avaliou a segurança do uso do óleo de hortelã durante exposição prolongada em baixas concentrações.

Os referidos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV): processo nº 114/2014 (Anexo I).

2.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para *Cyprinus carpio*

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos e dez repetições por tratamento, sendo cada peixe considerado uma repetição. As concentrações de óleo de hortelã testadas foram de 0, 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 175 mg L⁻¹, além de um grupo controle positivo com álcool etílico absoluto (175 mg L⁻¹), sem óleo de hortelã. Com base no teor de mentol presente no óleo de hortelã utilizado, as concentrações de óleo de hortelã utilizadas equivalem aproximadamente às seguintes concentrações de mentol: 0, 11,5; 23; 34,5; 46; 57,5; 69 e 80,5 mg L⁻¹.

Como o óleo de hortelã apresenta baixa solubilidade em água, para a obtenção das concentrações teste, foi preparada uma solução estoque de óleo de hortelã diluído em álcool etílico absoluto (solução estoque 10% - 100mg de óleo de hortelã/g de solução). Para tanto, utilizou-se o óleo de hortelã pimenta- LAZLO® (*Mentha piperita*) (tabela 1).

Tabela 1. Composição do óleo de hortelã pimenta^a.

Composto	%
Mentol	44-48
Mentona	24-28
Neomentol	9-14
Acetato de mentilo	5-7
Isomentol	2-3
β-cariofileno	1-2
Pineno	Menos de 1
1,8-cineol	Menos de 1

^a Método de análise: extração por cromatografia gasosa de alta resolução - coluna: HP5 30m x 0,25mm. Temperatura da Coluna: 50°C (3min), 3°C /min, até 170°C. Injetor: 200°C Split: 1/200. Detector FID: 200°C. Volume de injeção: 1 µl (concentração: 0,5% em clorofórmio).

Juvenis de *C. carpio* com peso médio de 10,83 ± 0,78 g e comprimento médio de 7,06 ± 0,48 cm foram aclimatados em aquários de 250L mantidos com aeração constante, filtro biológico e aquecedores ligados a termostato (27 °C) durante 15 dias. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente, com ração comercial extrusada contendo 32% de proteína bruta. Antes da realização do experimento, os peixes permaneceram em jejum por 24h.

O experimento foi conduzido utilizando dois aquários de vidro (um para anestesia e um para recuperação dos peixes após a anestesia) com volume útil de 10L de água. Durante a realização do experimento os aquários foram mantidos com aeração e aquecedores ligados a termostatos mantendo a temperatura constante (27 °C). No aquário de anestesia foi dissolvida a solução estoque (óleo de hortelã e álcool etílico absoluto) para se obter cada concentração de óleo de hortelã a ser avaliada. O aquário de recuperação foi mantido nas mesmas condições do aquário de anestesia, porém, com água sem anestésico. A água de ambos os aquários foi trocada a cada concentração testada.

Os peixes foram considerados anestesiados e recuperados ao atingirem o conjunto de comportamentos característicos descritos por Woody et. al. (2002) (tabela 2).

Tabela 2. Comportamentos característicos referentes aos estágios de anestesia e recuperação conforme descrito por Woody et. al. (2002)

Estágio	Comportamentos característicos
E1	Movimento opercular visivelmente lento ou errático.
E2	Perda esporádica de equilíbrio, dificuldade de se manter na posição vertical.
E3	Completa perda de equilíbrio, incapacidade de recuperar a posição vertical.
E4	Sem reação a estímulo tátil.
Recuperação (REC)	Habilidade de permanecer na posição vertical com recuperação da capacidade de nadar.

Dez juvenis foram individualmente colocados no aquário de anestesia e observados os padrões comportamentais característicos de cada estágio de anestesia. Ao atingirem o estágio 4 os peixes foram retirados do aquário, pesados, medidos e transferidos para o aquário de recuperação. A recuperação dos peixes também foi realizada individualmente. O tempo necessário para o aparecimento dos padrões comportamentais característicos de cada estágio de anestesia e recuperação foi medido por meio de cronômetro digital.

Após a recuperação, os peixes de cada tratamento foram transferidos para aquários de 60 L com aeração e temperatura constante (27° C) para o monitoramento da mortalidade durante 96 h.

Para a avaliação das respostas de estresse durante a anestesia, mais três peixes de cada tratamento foram anestesiados nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao atingirem o estágio 4 foi realizada a coleta de sangue para quantificação da glicose sanguínea. Para a retirada do sangue, o pedúnculo caudal foi cortado com bisturi e o sangue coletado por meio de seringa heparinizada. Para determinação de glicose sanguínea, o sangue foi depositado em tira reagente do aparelho monitor digital Accutrend® Plus Roche.

Em condições experimentais e de campo, muitas vezes, os peixes permanecem expostos ao anestésico por um período de tempo maior do que o necessário para atingir o estágio 4 de anestesia. Sendo assim, para avaliar a segurança do óleo de hortelã, outros 10 peixes foram individualmente anestesiados por um período de 5 minutos (Zahl et al, 2009). Foi monitorada a mortalidade durante a anestesia e por 96h após a recuperação dos peixes.

A avaliação do efeito dos níveis de óleo de hortelã sobre as variáveis avaliadas foi realizada por meio de análise de variância e regressão polinomial ou LRP - Linear Response Plateau ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors. Para escolha do modelo de regressão foi considerado a significância dos coeficientes de regressão, o comportamento das variáveis em estudo e a magnitude dos coeficientes de determinação, calculados em função da soma quadrados da regressão/soma quadrados de tratamentos.

2.2 Óleo de hortelã como sedativo em *Cyprinus carpio* submetidos ao transporte

Para determinar as concentrações de óleo de hortelã a serem utilizadas no transporte foi realizado um pré-experimento avaliando a segurança do uso do óleo de hortelã durante exposição prolongada (48 h). Juvenis de *C. carpio* com peso médio de $10,81 \pm 0,88$ g foram aclimatados em aquários de 1000L mantidos com aeração constante, filtro biológico e aquecedores ligados a termostato mantendo a temperatura da água em 27 °C, durante 15 dias. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente, com ração comercial extrusada contendo 32% de proteína bruta.

O pré-experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. Com base nos resultados do primeiro experimento, foram estabelecidas as seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹ de óleo de hortelã. Para

obtenção das concentrações teste foi preparada uma solução estoque de óleo de hortelã diluído em álcool etílico absoluto (solução estoque 10%- 100mg de óleo de hortelã/g de solução). Os peixes foram mantidos em jejum por 24h e em seguida foram colocados em sacos plásticos de polietileno de dimensões 45 X 28 cm. Os sacos continham 1,5 L de água com óleo de hortelã, preenchidos com cerca de dois litros de oxigênio. Foram utilizados 10 peixes por saco plástico, sendo que cada saco foi considerado uma repetição.

Os sacos plásticos foram mantidos no laboratório e após 48h foi realizada a abertura dos sacos e aferida a mortalidade dos peixes. Os peixes sobreviventes foram transferidos para aquários contendo 7 L de água com aeração e temperatura constante (27 ° C) para avaliação da mortalidade por 96h.

Para o transporte foram avaliadas as concentrações de óleo de hortelã menores ou iguais às concentrações que não causaram mortalidade dos peixes durante o pré-experimento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 4. Foram avaliadas três concentrações de óleo de hortelã (0; 15; 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã), dois tempos de jejum antes do transporte (12h e 24h) e quatro repetições. Vinte juvenis de *C. carpio* foram colocados em cada saco de polietileno de dimensões 45 X 28 cm, preenchidos com 1,5 L de água (13,33 peixes L⁻¹), cerca de dois L de oxigênio e óleo de hortelã nas concentrações testadas. Os sacos plásticos foram firmemente amarrados e transferidos para o porta-malas de um automóvel, que alternou períodos de movimento e parado (Nascimento 2013) durante 24h (Teo et al., 1989).

Para a coleta de sangue, os peixes foram eutanasiados com óleo de cravo (350 mg L⁻¹), o pedúnculo caudal foi cortado com bisturi e o sangue coletado por meio de seringa heparinizada. A glicemia sanguínea de dois peixes/repetição foi mensurada por meio de tiras reagentes com aparelho monitor digital Accutrend® Plus Roche. A coleta dos fragmentos branquiais (100 mg por peixe) de dois peixes/repetição foi realizada mantendo o peixe sobre uma bandeja com gelo e as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até o término das coletas. Em seguida os fragmentos foram armazenados em freezer -80°C para a realização das análises.

Após as 24h de transporte os sacos plásticos foram abertos e mensuradas as variáveis de qualidade de água: temperatura, pH e oxigênio dissolvido por meio de peagâmetro e oxímetro e amônia total por meio de kits colorimétricos. A amônia tóxica (NH₃) foi calculada com base na fórmula: amônia tóxica = amônia total/(1+10((0,0902-pH)+(2730/(273,2+temperatura))))).

Após a abertura dos sacos foi realizada a contagem dos peixes mortos. Para avaliação da glicose sanguínea e análise de estresse oxidativo foi realizada coleta de sangue e de fragmentos branquiais de seis peixes de cada unidade experimental. Para tanto, os peixes foram eutanasiados com óleo de cravo (350 mg L⁻¹) e as coletas foram realizadas através dos mesmos procedimentos descritos no experimento anterior.

Após o período de transporte, os peixes foram alojados em 24 aquários com 60 L de água, dotados de aeração e temperatura constante a 27°C. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia e monitorados para avaliação da mortalidade por 96h. Após esse período, três peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados com óleo de cravo (350 mg L⁻¹) para a retirada de sangue e coleta de fragmentos branquiais.

As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV. O tecido branquial (100 mg) foi homogeneizado em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e a suspensão foi centrifugada (12000 rpm à 4°C por 10 minutos). O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer -20°C para as análises da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) e de um produto da peroxidação lipídica malondialdeído (MDA). O pélete que restou foi armazenado em freezer -80°C para a análise das proteínas carboniladas.

Para catalase, a atividade enzimática foi mensurada no sobrenadante e determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mmol L⁻¹) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60s (Abei, 1984). Os resultados foram expressos em Unidades de CAT mg proteína⁻¹.

Para superóxido dismutase, a atividade enzimática foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm, baseando-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O₂⁻ e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000). Os resultados foram expressos em Unidades de SOD mg proteína⁻¹.

Para glutathione S-transferase, a atividade enzimática foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm por 60s (Habig et al., 1974). A atividade da GST foi expressa em μmol min⁻¹g⁻¹.

Para a determinação da concentração de malondialdeído o sobrenadante foi previamente misturado à solução de TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e HCL 0,25 N) e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 535 nm (Buege & Aust, 1978). Os resultados foram expressos em nmol MDA mg proteína⁻¹.

A dosagem das proteínas carboniladas foi feita baseando-se nos grupos carbonil da reação da proteína com a solução de dinitrofenilhidrazina (DNPH) e mensurado em espectrofotômetro a 370 nm (Levine et al., 1990). O total de proteínas carboniladas foi expresso em $\eta\text{mol mL}^{-1}$.

Para a avaliação do efeito dos níveis de óleo de hortelã sobre a taxa de mortalidade, glicose sanguínea e as variáveis de estresse oxidativo foi realizada análise de variância e o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors.

3. Resultados

3.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para juvenis de *Cyprinus carpio*

Não foram observados os comportamentos característicos de indução à anestesia nos peixes submetidos ao álcool etílico absoluto (175 mg L^{-1}) e a 25 mg L^{-1} de óleo de hortelã. Portanto, os tempos de indução e de recuperação da anestesia foram analisados a partir da concentração de 50 mg L^{-1} de óleo de hortelã (Tabela 3). Foi observado o comportamento de natação rápida nos peixes submetidos a todos os tratamentos antes do início do surgimento dos comportamentos característicos dos primeiros estágios de indução à anestesia.

Os juvenis de *C. carpio*, quando anestesiados com o óleo de hortelã, passaram sucessivamente pelos estágios de anestesia descritos por Woody (2002). A análise pelo modelo Linear Response Plateau (LRP) mostrou que o tempo de indução para cada estágio de anestesia em juvenis de *C. carpio* foi dose-dependente (Tabela 3). O tempo de indução de anestesia diminuiu linearmente com o aumento da concentração de anestésico até a concentração de 114 mg L^{-1} para o estágio um (Fig. 1), 136 mg L^{-1} para o estágio dois (Fig. 2), 103 mg L^{-1} para o estágio três (Fig. 3) e 94 mg L^{-1} para o estágio quatro (Fig. 4). A partir dessas concentrações o tempo de indução se estabiliza. Para o tempo de recuperação da anestesia observou-se efeito linear crescente da concentração de óleo de hortelã (Tabela 3 e Fig. 5).

Não foram observadas diferenças significativas para os valores de glicose sanguínea dos peixes submetidos às diferentes concentrações de óleo de hortelã (Tabela 4).

O óleo de hortelã foi capaz de promover anestesia profunda sem ocorrência de mortalidade durante a determinação dos tempos de indução e recuperação da anestesia. Porém, ocorreu pequeno sangramento pelas brânquias dos peixes anestesiados nas

concentrações de 150 e 175 mg L⁻¹. Durante as 96h de observação dos peixes após a recuperação da anestesia também não foi observada mortalidade dos animais.

Durante a avaliação da segurança do óleo de hortelã (exposição por 5 minutos) ocorreu 20% de mortalidade dos peixes expostos à concentração de 175 mg L⁻¹ de óleo de hortelã (Tabela 5).

Tabela 3. Valores médios do tempo (s) necessário para atingir os estágios de indução e recuperação da anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

Estágios de anestesia	CP	Concentração de óleo de hortelã (mg L ⁻¹)								CV (%)
		0	25	50	75	100	125	150	175	
Estágio 1 (E1) ¹ (s)	-	-	-	53	49	27	26	24	18	0,45
Estágio 1 (E2) ² (s)	-	-	-	94	91	52	48	38	34	0,44
Estágio 1 (E3) ³ (s)	-	-	-	194	137	75	72	64	72	0,50
Estágio 1 (E4) ⁴ (s)	-	-	-	260	167	100	99	85	104	0,48
Recuperação (REC) ⁵ (s)	-	-	-	87	123	126	187	263	273	0,60

CP= controle positivo (álcool etílico absoluto – 175 mg L⁻¹);

CV - coeficiente de variação;

¹LRP: 81,98 – 0,522x, Platô: 114 (R²=0,87)

²LRP: 133,69 – 0,714x, Platô: 136 (R²=0,86)

³LRP: 314,42 – 0,239x, Platô: 103 (R²=0,99)

⁴LRP: 447,1 – 3,74x, Platô: 94 (R²=0,91)

⁵Efeito Linear: Y = 1,6151x - 5,2305 (R²=0,94)

Tabela 4. Valores médios de glicose sanguínea em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos à anestesia em diferentes concentrações de óleo de hortelã.

	CP	Concentrações de óleo de hortelã (mg L ⁻¹)								CV (%)
		0	25	50	75	100	125	150	175	
Glicose sanguínea ^{ns} (mg dL ⁻¹)	92	101	98	92	109	99	95	95	108	0,14

CP= controle positivo (álcool etílico absoluto – 175 mg L⁻¹);

CV - coeficiente de variação;

ns: não significativo para as concentrações de óleo de hortelã pela análise de variância ao nível de 5% de probabilidade;

Tabela 5. Valores médios de taxa de sobrevivência em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã durante avaliação da segurança do uso do óleo de hortelã como anestésico em 5 minutos de exposição.

	Concentração de óleo de hortelã (mg L ⁻¹)					
	50	75	100	125	150	175
Taxa de sobrevivência (%)	100	100	100	100	100	80

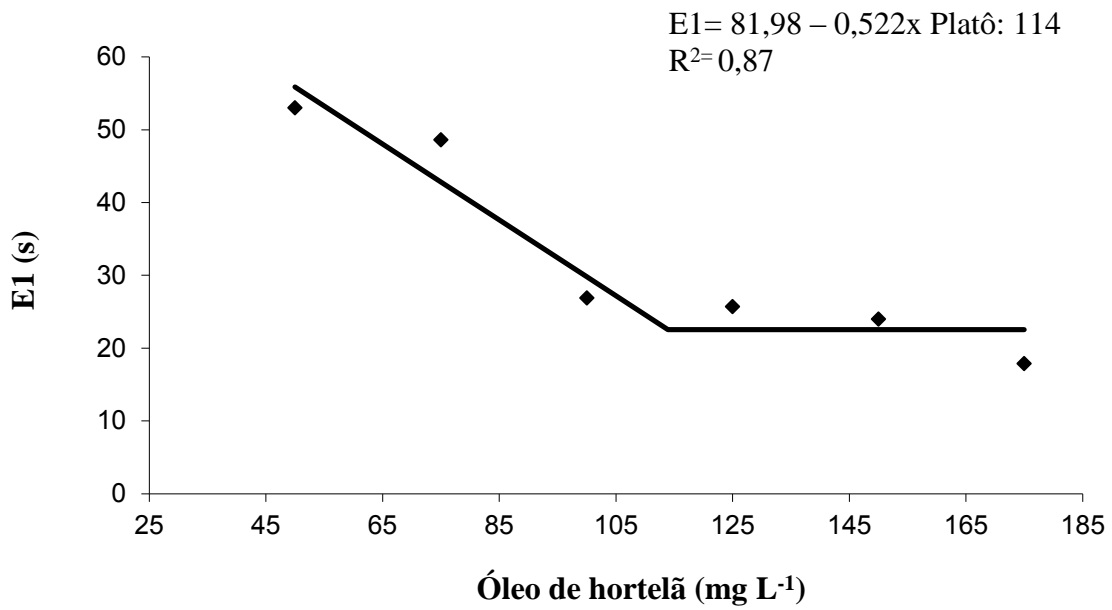


Fig. 1. Tempos de indução (s) para o estágio 1 (E1) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

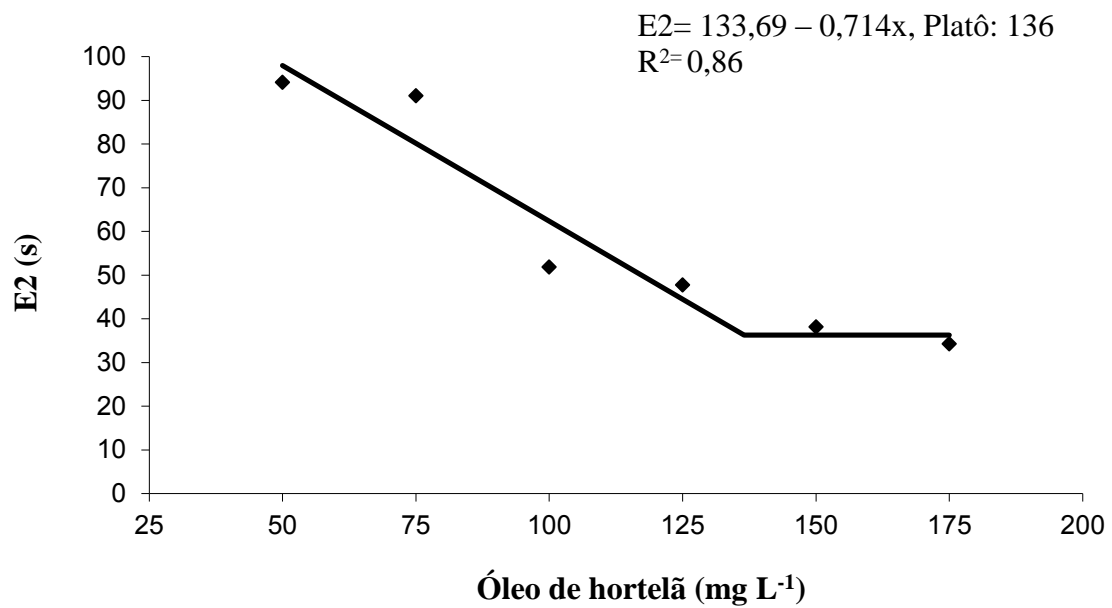


Fig. 2. Tempos de indução (s) para o estágio 2 (E2) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

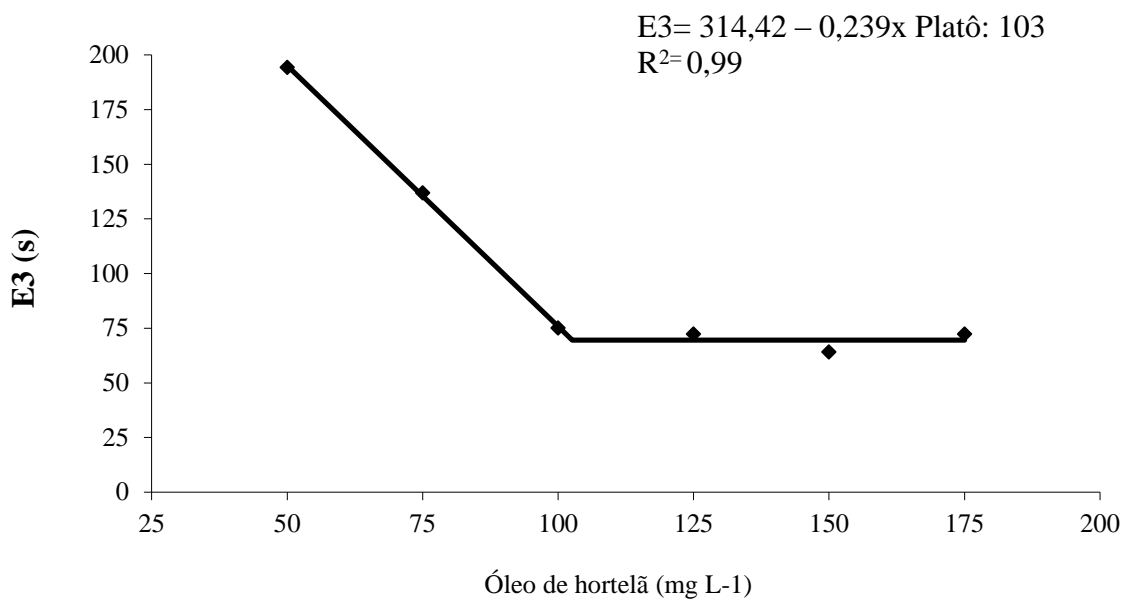


Fig. 3. Tempos de indução (s) para o estágio 3 (E3) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

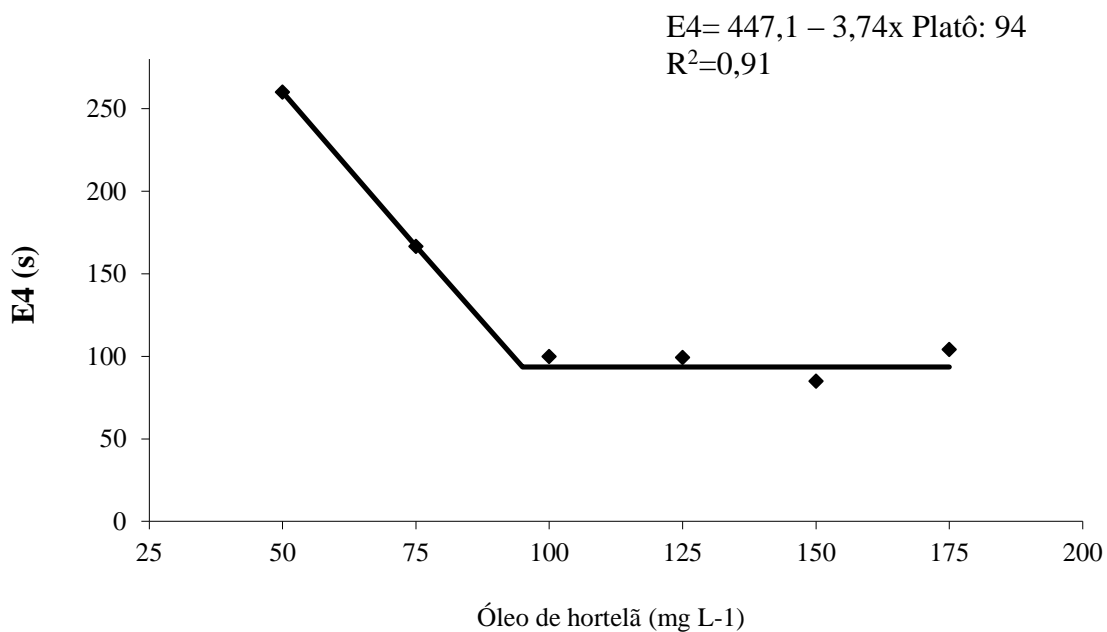


Fig. 4. Tempos de indução (s) para o estágio 4 (E4) de anestesia em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

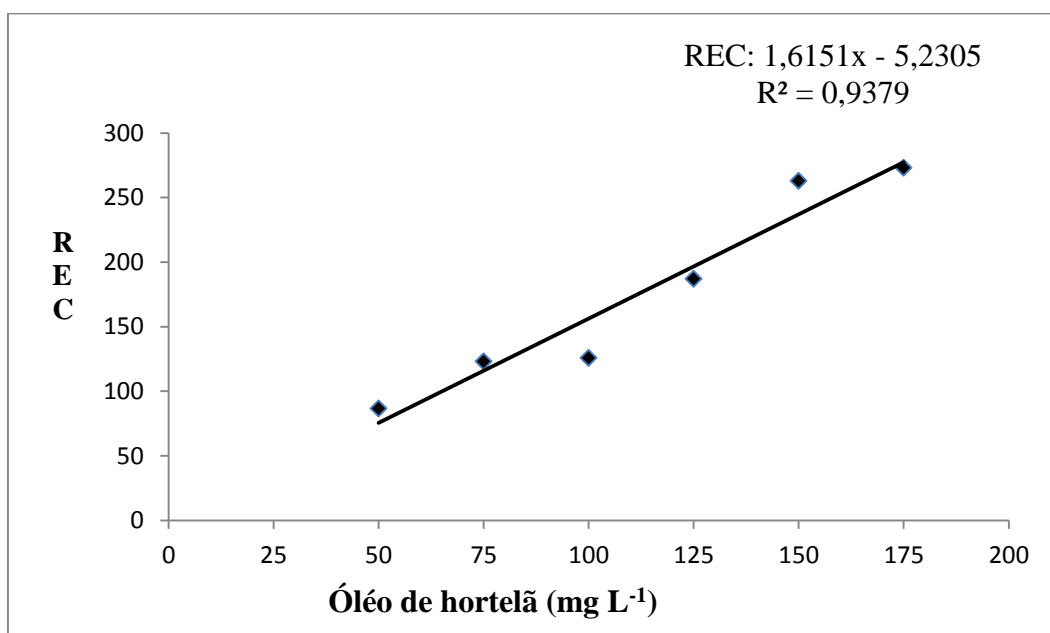


Fig. 5. Tempos de recuperação (s) de anestesia (REC) em juvenis de *Cyprinus carpio* submetidos a diferentes concentrações de óleo de hortelã.

3.2 Óleo de hortelã como sedativo em *Cyprinus carpio* submetidos ao transporte

Durante a exposição prolongada ao anestésico a taxa de sobrevivência dos peixes foi de 100% nas concentrações de 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã. A concentração de 40 mg L⁻¹ apresentou taxa de sobrevivência de 93%. Já na concentração de 50 mg L⁻¹ a sobrevivência foi zero (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios de taxa de sobrevivência de juvenis de *Cyprinus carpio* expostos a baixas concentrações de óleo de hortelã durante exposição prolongada (48h).

	Concentração de óleo de hortelã (mg L ⁻¹)					CV(%)
	10	20	30	40	50	
Taxa de sobrevivência (%)	100	100	100	93	0	0,46

CV - coeficiente de variação;

Não houve efeito da interação entre o óleo de hortelã e o tempo de jejum, assim como não foi observado efeito significativo da concentração de óleo de hortelã sobre as variáveis de estresse oxidativo avaliadas (Tabela 7). Não foi observado efeito significativo do tempo de jejum sobre a atividade da enzima GST, bem como para o MDA e proteínas carboniladas.

Houve aumento da atividade das enzimas CAT e SOD nos peixes que foram submetidos a 24 horas de jejum em relação aos que foram submetidos a 12 horas de jejum (Tabela 7).

Para glicose sanguínea e taxa de sobrevivência observou-se efeito significativo do óleo de hortelã. Os peixes submetidos ao transporte na concentração de 30 mg L⁻¹ apresentaram maiores valores de glicose sanguínea e menor taxa de sobrevivência do que os peixes transportados sem óleo de hortelã. Não foi observado efeito significativo do tempo de jejum para glicose sanguínea e taxa de sobrevivência (Tabela 8).

Para as variáveis da qualidade da água não foi observado interação significativa entre o óleo de hortelã e o tempo de jejum, assim como não foi observado efeito significativo do tempo de jejum. Para o oxigênio dissolvido observou-se efeito significativo do óleo de hortelã para o teste F, mas não para o teste de Dunnett. Para as demais variáveis da qualidade da água não foram observadas diferenças significativas do óleo de hortelã (Tabela 9).

Tabela 7. Valores médios das variáveis de estresse oxidativo após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum antes do transporte.

	Efeito da interação óleo de hortelã e tempo de jejum	Efeito do óleo de hortelã	Óleo de hortelã			Efeito do tempo de jejum	Tempo de jejum (h)		CV (%)
			0	15	30		12	24	
MDA ($\eta\text{mol mg}^{-1}$)	ns	ns	0,0063	0,0083	0,0060	ns	0,0061	0,0080	0,38
Prot C ($\eta\text{mol mL}^{-1}$)	ns	ns	8,2855	8,1549	10,1257	ns	9,2211	8,4897	0,43
GST ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	ns	ns	4,8748	4,4147	5,1327	ns	1672,07	1367,92	0,24
CAT (UC mgp^{-1})	ns	ns	0,0053	0,0067	0,0066	p=0,0529	0,0055 ^b	0,0070 ^a	0,30
SOD (US mgp^{-1})	ns	ns	0,0537	0,0780	0,0647	p= 0,0054	0,0515 ^b	0,0794 ^a	0,39

MDA – malondialdeído, GST – glutathione S – transferase, CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, Prot. C – proteínas carboniladas;

CV - coeficiente de variação;

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade;

Médias na linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

Tabela 8. Valores médios da glicose sanguínea e taxa de sobrevivência após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum antes do transporte.

	Efeito da interação óleo de hortelã e tempo de jejum	Efeito do óleo de hortelã	Óleo de hortelã			Efeito do tempo de jejum	Tempo de jejum (h)		CV (%)
			0	15	30		12h	24h	
Glicose (mg dL ⁻¹)	ns	p= 0,0303	137,1 ^a	148,2 ^a	192,8 ^b	ns	171,4 ^a	147,4 ^a	0,30
Taxa de sobrevivência (%)	ns	p=0,0094	100 ^a	100 ^a	91,9 ^b	ns	95 ^a	88,8 ^a	0,06

CV - coeficiente de variação;

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade;

Médias na linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

Tabela 9. Valores médios das variáveis de qualidade de água após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum antes do transporte.

	Efeito da interação óleo de hortelã e tempo de jejum	Efeito do óleo de hortelã	Óleo de hortelã			Efeito do tempo de jejum	Tempo de jejum (h)		CV (%)
			0	15	30		12	24	
			pH	ns	ns		6,8	6,6	
T (°C)	ns	ns	22,7	22,5	23,1	ns	22,9	22,6	0,06
O ₂ (%)	ns	p=0,0530	20,5 ^a	18,6 ^a	26,4 ^a	ns	21,9	21,7	0,32
AT (mg L ⁻¹)	ns	ns	0,07	0,06	0,05	ns	0,06	0,05	1,1

T. – temperatura; O₂ – oxigênio dissolvido; AT – amônia tóxica;

CV - coeficiente de variação

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade;

Médias na linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

Após 96 h de recuperação não foi observado interação significativa entre óleo de hortelã e tempo de jejum, bem como não foi observado efeito do óleo de hortelã sobre as variáveis de estresse oxidativo avaliadas (Tabela 10). Observou-se aumento dos níveis de MDA e da atividade das enzimas CAT e SOD nos peixes submetidos a 24 horas de jejum quando comparado com os peixes submetidos a 12 horas de jejum. Não foi observado efeito do tempo de jejum sobre a atividade da enzima GST e a concentração de proteínas carboniladas (Tabela 10).

Para glicose sanguínea e taxa de sobrevivência não foi observado interação significativa entre óleo de hortelã e tempo de jejum, assim como não houve efeito do óleo de hortelã e do tempo de jejum (Tabela 11).

Tabela 10. Valores médios das variáveis de estresse oxidativo 96 horas após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos jejum.

	Efeito da interação óleo de hortelã e tempo de jejum	Efeito do óleo de hortelã	Óleo de hortelã			Efeito do tempo de jejum	12h	24h	CV (%)
			0	15	30				
MDA ($\eta\text{mol mg}^{-1}$)	ns	ns	0,0070	0,0083	0,0063	p= 0,0540	0,0065b	0,0079a	0,26
Prot C ($\eta\text{mol mL}^{-1}$)	ns	ns	3,9019	4,4461	3,9993	ns	4,0438	4,1877	0,40
GST ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	ns	ns	3,4590	2,5719	2,3264	ns	3,2552	2,3164	0,45
CAT (UC mgp^{-1})	ns	ns	0,0044	0,0052	0,0052	p= 0,0123	0,0039 ^b	0,0059 ^a	0,42
SOD (US mgp^{-1})	ns	ns	0,0426	0,0470	0,0422	p= 0,0024	0,0352 ^b	0,0527 ^a	0,30

MDA – malondialdeído, GST – glutathiona S – transferase, CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, Prot C – proteínas carboniladas;

CV - coeficiente de variação;

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade;

Médias na linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunnett ao nível de 5% de probabilidade;

Tabela 11. Valores médios de glicose sanguínea e taxa de sobrevivência 96 horas após o transporte de juvenis de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de óleo de hortelã e tempos de jejum.

	Efeito da interação óleo de hortelã e tempo de jejum	Efeito do óleo de hortelã	Óleo de hortelã			Efeito do tempo de jejum	12h	24h	CV (%)
			0	15	30				
Glicose (mg dL ⁻¹)	ns	ns	52,1	54,3	49,7	ns	52,5	51,5	0,19
Sobrevivência (%)	ns	ns	100	100	98,1	ns	84,7	100	0,03

CV - coeficiente de variação;

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade;

4. Discussão

4.1. Eficácia e segurança do óleo de hortelã como anestésico para juvenis de *Cyprinus carpio*

A ausência de comportamentos característicos dos estágios de anestesia em juvenis de *C. carpio* submetidos ao controle positivo (álcool etílico absoluto) confirma que o álcool, em baixas concentrações, não apresenta propriedades anestésicas em peixes (Munday e Wilson, 1997).

O óleo de hortelã é eficaz como anestésico para *C. carpio*, uma vez que promoveu anestesia em tempo menor ou igual a 180 segundos (três minutos) e recuperação em até 300 segundos (cinco minutos), conforme critério estabelecido por Marking e Meyer (1985). Para indução a anestesia leve (E1 e E2 - sedação), a concentração de 50 mg L⁻¹ é a mais adequada. Entretanto, para alcançar a anestesia profunda, a concentração de óleo de hortelã estimada para atingir o estágio 3 é de 56,34 mg L⁻¹ e para atingir o estágio 4 é de 71,41 mg L⁻¹. Com base no teor de mentol do óleo de hortelã utilizado no presente estudo, as concentrações calculadas de mentol que promovem anestesia profunda em *C. carpio* variam entre 24,79 a 34,28 mg L⁻¹ de mentol.

A eficácia do mentol como anestésico foi demonstrada para várias espécies de peixes tropicais. As menores concentrações de mentol necessárias para indução de anestesia profunda foram de 50 mg L⁻¹ para *Astyanax altiparanae* de 6,5 g (Pereira-da-Silva et. al, 2014), de 60 mg L⁻¹ para *Salminus brasiliensis* de 194g (Padua et. al., 2010), de 100 mg L⁻¹ para *Piaractus mesopotamicus* de 110g (Gonçalves et al., 2008) e de 150 mg L⁻¹ para *Colossoma macropomum* de 90g (Façanha e Gomes, 2005). As menores concentrações de mentol necessárias para anestésiar juvenis de *C. carpio* (24,79 a 34,28 mg L⁻¹) em relação as demais espécies são decorrentes, provavelmente, das diferenças de tamanho entre os peixes, uma vez que a sensibilidade aos anestésicos pode ser influenciada pelo peso do animal (Zahl, 2012). Como as brânquias são as principais vias de absorção (e eliminação) dos anestésicos (Hayton, 1996), e a relação entre a área de superfície branquial e o peso corporal diminui com o aumento do tamanho do animal (Muir 1969; Zahl et al., 2011), peixes menores tendem a ser mais sensíveis aos anestésicos (Zahl et al., 2009).

Kasai et al. (2014) sugerem que os receptores para o neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA) devem mediar os efeitos anestésicos do mentol em peixes, uma vez a ativação desses receptores em *Thalassoma pavo* causou redução da

natação e aumento do tempo parado (Facciolo et al., 2010). Além disso, Kasai et al. (2014) observaram que um pré tratamento com um antagonista seletivo para os receptores GABA_A prolongou o tempo de latência de indução à anestesia pelo mentol em *Oryzias latipes* e *C. auratus*.

Doses mais altas de óleo de hortelã promoverem menores tempos de indução a anestesia, porém, demandam maior tempo de recuperação e podem causar sangramento nas brânquias e mortalidade. Entretanto, as concentrações que promovem anestesia profunda (56,34 - 71,41 mg L⁻¹) são bem menores que as que causam prejuízos em *C. carpio* (acima de 150 mg L⁻¹), demonstrando a segurança do uso de óleo de hortelã como anestésico. Pereira-da-Silva et. al. (2014) constataram que doses acima de 100 mg L⁻¹ de mentol não são consideradas seguras para alevinos (0,6g) e juvenis (6,5g) de *A. altiparanae* uma vez que houve mortalidade de 20% nessa concentração, quando realizada a exposição contínua por 6 minutos. Para juvenis de *C. macropomum* (75g), o mentol apresentou boa margem de segurança, pois não ocorreu mortalidade nos peixes expostos por dez minutos a concentrações de até 250 mg L⁻¹ (Façanha e Gomes, 2005).

A ausência de efeito significativo do óleo de hortelã sobre a glicemia sanguínea indica que este anestésico não altera as respostas de estresse de *C. carpio*, quando expostos por até cinco minutos. Entretanto, Pereira-da-Silva et al. (2014) observaram aumento da glicose em *A. altiparanae* quando expostos a 50 mg L⁻¹ de mentol por três minutos. O aumento da glicose também foi observado em *C. macropomum* nas concentrações de 200 mg L⁻¹ e 250 mg L⁻¹ quando comparado aos peixes expostos à concentração de 100 mg L⁻¹ de mentol (Façanha e Gomes, 2005).

4.2. Óleo de hortelã como sedativo em *Cyprinus carpio* submetidos ao transporte

O aumento na mortalidade dos peixes submetidos ao transporte na concentração de 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã ocorreu, provavelmente, pelo efeito sinérgico do estresse causado pelo transporte e pela exposição por tempo prolongado (24h) ao anestésico, uma vez que a exposição de *C. carpio* a essa mesma concentração, durante 48h, sem o estresse do transporte não causou mortalidade. Em condições de estresse ocorre o aumento do consumo de oxigênio (Zahl et al., 2012), da taxa de perfusão sanguínea das brânquias e da taxa de ventilação branquial (Randall e Perry, 1992), porém, o mentol causa redução da taxa de ventilação branquial (Façanha e Gomes

2005). Assim, o aumento na mortalidade pode ter sido causado pelo comprometimento entre a necessidade de oxigênio e a taxa de ventilação branquial.

O aumento na glicemia sanguínea dos peixes submetidos a 30 mg L⁻¹ de óleo de hortelã indica que os peixes ficaram mais estressados que os peixes do tratamento controle. O mentol presente no óleo de hortelã pode ter induzido as respostas de estresse em *C. carpio* pela ativação de receptores de frio-dor TRPA1, uma vez que Kasai et al. (2014) sugerem que o mentol ativa esses receptores em *Danio rerio* e *Carassius auratus* e que o mentol em altas concentrações induz a hiperalgesia (Hatem et al., 2006). Assim, a dor causada pelo mentol poderia induzir as respostas de estresse nos peixes. Pereira-da-Silva et al. (2014) observaram que *A. altiparanae* submetidos à anestesia por mentol (50 mg L⁻¹), em condições de estresse, apresentaram concentração de glicose mais alta que os peixes submetidos apenas ao estresse ou ao mentol. A ausência de efeito do óleo de hortelã na concentração de 15 mg L⁻¹ sobre a glicemia sanguínea indica que essa concentração não altera as respostas de estresse de *C. carpio* e, portanto, é segura como sedativo. Porém, não é recomendado o uso do óleo de hortelã como sedativo durante o transporte, uma vez que não reduziu o estresse dos peixes quando comparado com o controle.

O jejum pode causar estresse oxidativo (Welker e Congleto, 2005) com aumento da liberação de radicais livres de oxigênio (Robinson et al., 1997) e consequente ativação das defesas antioxidantes (Zhang, et al. 2007; Bayir et. a., 2011). Assim, a maior atividade das enzimas CAT e SOD em *C. carpio* submetidos a 24h de jejum (após o transporte e após recuperação do transporte) pode ser explicada pela sequência de ações do sistema de defesa antioxidante dos animais. Dentre as enzimas antioxidantes, a SOD tem função de converter ânions superóxidos (O₂⁻) em água (H₂O) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), assim sendo, o aumento da atividade da SOD causa aumento nos níveis de H₂O₂ intracelulares (Morales et. al., 2004). Isso explica o concomitante aumento da atividade da enzima CAT, responsável principalmente por converter H₂O₂ em metabólitos menos tóxicos para as células (Romero et. al., 2011). Como *C. carpio* não tem estômago, o tempo de passagem do alimento pelo sistema digestório é menor (4 a 5h – dados não publicados) do que em peixes com estômago. Dessa forma, nessa espécie é provável que as alterações nos radicais livres e no sistema de defesa antioxidante, devido ao jejum, sejam mais rápidas do que em espécies de peixes que apresentam estômago e consequentemente maior tempo de passagem do alimento. O aumento da atividade das enzimas SOD e CAT nos peixes submetidos à

24h de jejum indica um provável aumento no estresse oxidativo nesses animais e, portanto, o jejum de 12 horas é mais indicado para o transporte de *C. carpio*.

5. Conclusões

O óleo de hortelã é eficaz como anestésico para juvenis de *C. carpio* em concentrações acima de 50 mg L⁻¹.

O óleo de hortelã é seguro como anestésico para *C. carpio* em concentrações até 150 mg L⁻¹ por 5 minutos.

O óleo de hortelã é seguro como sedativo para *C. carpio* em concentrações até 15 mg L⁻¹ por 24 horas.

O óleo de hortelã não reduz as respostas de estresse e os danos oxidativos durante o transporte de *C. carpio*.

O jejum de 24 h causa maior estresse oxidativo em *C. carpio* quando comparado ao jejum de 12 h.

6. Referências bibliográficas

- Abele D., Vazquez-Medina J. P., Zenteno-Savin T. (2012) Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. John Wiley & Son, 548 p.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology* **105**, 121-126.
- Altun, T. & Danabas, D. (2006) Effects of short and long exposure to the anesthetic 2-phenoxyethanol mixed with ethyl alcohol on common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) fingerlings *Israeli Journal Aquaculture* **58**, 178–182.
- Bandell M., Story G.M., Hwang S.W. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849-57.
- Barcellos L., Kreutz L., Quevedo R. (2006) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Aquaculture* **253**, 317–321.
- Barton B.A (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrate Comparative Biology* **42**, 517–525.
- Bautista D.M., Movahed P., Hinman A. (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 12248-12252.
- Bayir A., Sirkecioglu A.N., Bayir M., Aras N.M., Haliloglu H.I., Kocaman E.M., Aras M.N. (2011) Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comparative Biochemistry and Physiology* **159**, 191-196.
- Berschneider H. M (2002) Complementary and Alternative Veterinary Medicine and Gastrointestinal Disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* **17**, 19-24.
- Buege, J.A. Aust, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymology* **52**.
- Burt, S.A.; R.D. Reinders. (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 162-167.
- Carvalho, E.S.; Gomes, L.C.; Brandão, F.R.; Crescêncio, R.; Chagas, E.C.; Anselmo, A.A.S. (2009) Uso do probiótico Efinol®L durante o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61**, 1322-1327.
- Cunha, M.A., 2007. Anestesia em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a substâncias isoladas de plantas. Santa Maria. 65p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria).
- Dagar A., Zilberg D., Cohen Z., Boussiba S., Khozin-Goldberg, I. (2010) Short-term dietary supplementation with the microalga *Parietochloris incisa* induces stress resistance in guppies (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture Research* **41**, 267-277.
- Dieterich S., Bielick U., Beulich K., Hasenfuss G., Prestle J. (2000). Gene expression end-stage failing heart. *Circulation* **101**, 33-9.
- Façanha M.F. & Gomes L.C. (2005) A eficácia do mentol como anestésico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta Amazonica* **35**, 71–75.
- Facciolo R.M, Crudo M., Giusi G., Canonaco M., (2010) GABAergic influence on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology* **243**, 77-86.
- Gherman C., Culea M., Cozar, O. (2000) Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta* **53**, 253–262.
- Gomelsky B., Cherfas N.B., Ben-Dom N., Hulata G. (1996) Color inheritance in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio* L.) inferred from color variability in

- normal and gynogenetic progenies. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **48**, 219–230.
- Goncalves A.F.N., Santos E.C.C., Fernandes J.B.K., Takahashi L.S. (2008) Mentol e eugenol como substitutos da benzocaina na indução anestésica de juvenis de pacu. *Acta Scientiarum Animal Science* **30**, 339–344.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S- Transferases: The First Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymology* **233**, 346-357.
- Hayton W.L., Szoke A., Kemmenoe B.H., Vick A.M. (1996) Disposition of benzocaine in channel catfish. *Aquaculture Toxicology* **36**, 99–113.
- Hickling S., Martin M.T., Brewster B., (2007) *The Essential Book of Koi: A Complete Guide to Keeping and Care*. TFH Publications Inc. **256**.
- Hovda J., Linley T.J. (2000) The potential application of hypothermia for anesthesia in adult pacific salmon. *North American Journal Aquaculture* **62**, 67-72.
- Inoue L.A.K.A., DosSantos Neto C., Moraes, G. (2003) Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Ciência Rural* **33**, 943-947.
- Inoue L.A.K.A., Hackbarth A., Moraes G. (2010) Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **11**, 909-918.
- Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-5.
- Kasai M., Hososhima S., Yun-Fei L. (2014) Menthol Induces Surgical Anesthesia and Rapid Movement in Fishes. *The Open Neuroscience Journal* **8**, 1-8.
- Kuroki T., (1981). *The Latest “Manual to Nishikigoi”*. Shin Nippon Kyoiku Toshō **272**.
- Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G., Ahn B. W., Shaltiel S., Stadtman E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology* **186**, 464–478.
- Lowry H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-215.
- Marking L.L., Meyer F.P. (1985) Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* **10**, 2–5.
- McKay D.L., Blumberg J.B. (2006) A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.) *Phytotherapy Research* **20**, 619–633.
- Morales A.E., Pérez-Jiménez A., Hidalgo M.C., Abellán E., Cardenete G. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology* **139**, 153-161.
- Muir B.S. (1969) Gill dimensions as a function of fish size. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **26**, 165–170.
- Munday P. L. & Wilson S. K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anesthetization of *Pomacentrus amoboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology* **51**, 931–938.
- Nascimento L. S. (2013) *Cúrcuma (Curcuma longa) em dietas para juvenis de Trichogaster labiosa*. Viçosa, Minas Gerais. 47p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa).
- Olivier, K. (2001) *The ornamental fish market*. FAO/Globefish Research Programme, United Nations Food and Agriculture Organisation. **67**.

- Padua S.B., Pietro P.S., Iglessias-Filho P.S., Ishikawa M.M. & Hisano H. (2010) Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). *Boletim do Instituto de Pesca* **36**, 143–148.
- Pan C.H., Chien Y.H., Wang Y.J. (2010) The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Research* **41**, 973-981.
- Pereira-da-Silva E. M., Oliveira R. H. F., Del Nero B. (2014) Menthol as anaesthetic for lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000): attenuation of stress responses. *Aquaculture Research*, 1-8.
- Pittler M.H., Ernst E. (1998) Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. *American Journal of Gastroenterology* **93**, 1131–1135.
- Randall D.J. & Perry S.F. (1992) Catecholamines. In Hoar, W.S., Randall, D.J. and Farrell, A.P., *Fish Physiology*, **Vol. XIIB** New York/London: Academic Press 255–300.
- Robinson M.K., Rustum R.R., Chambers E.A., Rounds J.D., Wilmore D.W., Jacobs D.O. (1997) Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *Journal of Surgical Research* **69**, 325-330.
- Romero M.C., Tapella F., Sotelano M.P., Ansaldo M., Lovrich G.A. (2011). Oxidative stress in the subantarctic false king crab *Paralomis granulosa* during air exposure and subsequent re-submersion. *Aquaculture* **319**, 205-210.
- Sang J.P. (1982) Estimation of menthone, menthofuran, menthyl acetate and menthol in peppermint oil by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **253**, 109–112.
- Sharma N., Jacob D. (2002) Assessment of reversible contraceptive efficacy of methanol extract of *Mentha arvensis* L. leaves in male albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **80**, 9-13,
- Srivastava R.K., Singh A.K., Kalra A., Tomar, V.K.S., Bansal R.P., Patra D.D., Chand S., Naqvi A.A., Sharma S., Kumar S. (2002) Characteristics of menthol mint *mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. *Industrial crops and products* **15**, 189-198.
- Tamadachi M. (1990) *The Cult of the Koi*. T.F.F. Publications Neptune City. 213–272.
- Tavish H.M., Harris D. (2002) An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/ lavandin production and peppermint/ spearmint production with UK production techniques and costs. *Government-Industry Forum on non-Food Uses of Crops* 58p.
- Teo L.H., Chen T.W., Lee B.H. (1989) Packaging of the guppy, *Poecilia reticulata*, for air transport in a closed system. *Aquaculture* **78**, 321-332.
- Vidal L. V. O., Albinati R. C. B., Albinati A. C. L., Lira A. D., Almeida T. R., G. B. Santos (2008) Eugenol como anestésico para tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**, 1069- 1074.
- Welker T.L., Congleton J.L. (2005). Oxidative Stress in Migrating Spring Chinook salmon Smolts of Hatchery Origin: Changes in Vitamin E and Lipid Peroxidation. *Transactions in American Fisheries Society* **134**, 1499-1508.
- Wilhelm Filho D., Sell F., Ribeiro L., Ghislandi M., Carrasquedo F., Fraga C.G., Wallauer J.P., Simões-Lopes P.C., Uhart M.M. (2002) Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **133**, 885–892.

- Wilhelm Filho D., Tribess T., Gáspari C., Claudio F.D., Torres M.A., Magalhães A.R.M. (2001). Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* **203**, 149–158.
- Woody C.A., Nelson J., Ramstad K. (2002) Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology* **60**, 340–347.
- Zahl I.H., Kiessling A., Samuelsen O.B., Hansen M.K. (2009) Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*)- effect of pre-anaesthetic sedation and importance of body weight, temperature and acute stress. *Aquaculture* **295**, 52–59.
- Zahl I.H., Kiessling A., Samuelsen O.B., Hansen M.K. (2011) Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. *Aquaculture Research* **42**, 1235–1245.
- Zahl I.H., Samuelsen O., Kiessling A. (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 201–218.
- Zhang X.D., Wu T.X., Cai L.S., Zhu Y.F. (2007). Influence of fasting on muscle composition and antioxidant defenses of market-size *Sparus macrocephalus*. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**, 906-911.