

## ANÁLISE DO POTENCIAL EPILÉTICO DE PLANTAS NATIVAS SOBRE PEIXES

Marissol Leite da Silva (Bolsista/Apresentador)<sup>1</sup> – Unifesspa

*e-mail* marissolleite@unifesspa.edu.br

Diogenes Henrique de Siqueira Silva (Coordenador(a) do Projeto)<sup>2</sup> - Unifesspa

*e-mail* [siqueira.diogenes@gmail.com](mailto:siqueira.diogenes@gmail.com)

**Agência Financiadora:** UNIFESSPA/PNAES

**Eixo Temático/Área de Conhecimento:** Biologia reprodutiva/Biologia

### 1. INTRODUÇÃO

Em pisciculturas protocolos de anestesia e sedação são amplamente utilizados para manter o bem-estar, evitar o dano físico e minimizar o estresse de espécies de peixes durante o manejo em triagem, transporte, procedimentos cirúrgicos e reprodução artificial (Sneddon, 2012). Pois, estudos recentes sugerem que os peixes teleosteos são capazes de nocicepção, ou seja, eles podem perceber a dor através de receptores para a sensação de estímulos potencialmente dolorosos, que são semelhantes aos encontrados em mamíferos (Sneddon, 2012; Da Silva et al., 2018).

Esta temática é discutida e comentada, de modo que a dor é demonstrada como uma resposta fisiológica, como, inflamação e reação comportamental ao estímulo (comportamento nocifensivo) (Dawkins 2006; Mendl & Paul 2004, 2008; Paul et al. 2005). Segundo Broom (2014), a sensibilidade pode estar relacionada com a capacidade de sentir emoções positivas ou negativas. Ou ainda, como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos teciduais reais ou potenciais (IASP Task Force on Taxonomy, 1994). Isto pode ser evidenciado em um comportamento flexível em peixes (Sneddon et al. 2003), como na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, cujos espécimes estimulados com ácido acético a 1%, aumentaram significativamente a taxa de batimentos operculares e mostraram um comportamento anômalo de nadar, movendo de um lado para o outro a nadadeira peitoral enquanto descansavam no fundo. Comportamento semelhante foi percebido em peixe-zebra (*Danio rerio*), e os espécimes também aumentaram sua taxa de batimento opercular e tenderam a ocupar o fundo do tanque após um corte da nadadeira caudal (Schroeder & Sneddon, 2017) ou a injeção de 1% de ácido acético (Maximino, 2011), confirmando a ideia levantada por Sneddon et al. (2003) de que quando o animal recebe um estímulo nocivo, o comportamento nocifensivo é induzido e, então, o animal aprende que determinado estímulo é desagradável e o evita no futuro.

Entretanto, pouco se sabe a respeito das sensações dos peixes nos procedimentos anestésicos e sedativos. Normalmente, apenas a dosagem dos compostos para a sedação (Heldwein et al. 2014), anestesia (Barbas et al., 2017; Mazandarani et al., 2017) e dose letal (Chance et al., 2018; Mascaro et al., 1998) são avaliados. Em trabalhos recentes de nosso laboratório identificamos também a ação anestésica dos extratos de folhas das plantas Jambú *Spilanthes acmella* e João brandinho *Piper calossum* nas espécies de peixe Zebrafish *Danio rerio* e no Tetra de prata *Ctenopoma sp.* Contudo, as análises do comportamento dos animais submetidos àqueles extratos revelaram uma semelhança ao ataque epilético induzido em zebrafish com a utilização de Pilocarpina nos trabalhos de Pinto (2015) e Vermosen et al. (2011).

### 2.1. MATERIAS E MÉTODOS

#### 2.2 Animais

Foram utilizados espécimes sexualmente maduros do tetra de prata *Ctenopoma sp.* provenientes da Fazenda Primavera, KM 64, BR 222 no município de Bom Jesus – PA (05°03'05" S, 48°36'32"O), altitude de 175 metros. Os zebrafish *D. rerio* foram adquiridos de fornecedor comercial em Belém-PA. Os animais passaram por um período de 14 dias de aclimação antes do período experimental e foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial 47% de proteína bruta e nauplios de artemia salina. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do período experimental.

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências biológicas - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

<sup>2</sup>Doutor em Biologia - Professor Titular Adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACBIO/IESB/Unifesspa). Coordenadora do Projeto de pesquisa Analise do potencial epilético de plantas nativas sobre peixes.

### 2.3 Obtenção do extrato bruto

A espécie de planta Jambú *S. acmella* foi adquirida em comercio local na cidade de Marabá-PA. e o João brandinho *P. calossum* foi coletado na zona rural -Palmares II na cidade de Parauapebas-PA.

Os extratos foram produzidos a partir das folhas frescas das plantas. A extração do material vegetal foi conduzida pelos métodos de trituração (Moinho de facas tipo Wyllie micro – te 650), seguido de maceração, a fim de extrair o maior volume possível de compostos secundários. Para tal, cada órgão das plantas foi lavado em água corrente e água destilada, seco em papel toalha, triturado, pesado em balança analítica (Modelo ATY224 com capela Shimadzu) e reservado. Em seguida, macerado em álcool 70% em proporções de 1 g:1 ml e 1 g:5 ml (órgão da planta: Álcool 70%). O extrato obtido foi filtrado em papel filtro e a solução filtrada (extrato vegetal) armazenada em vidro âmbar.

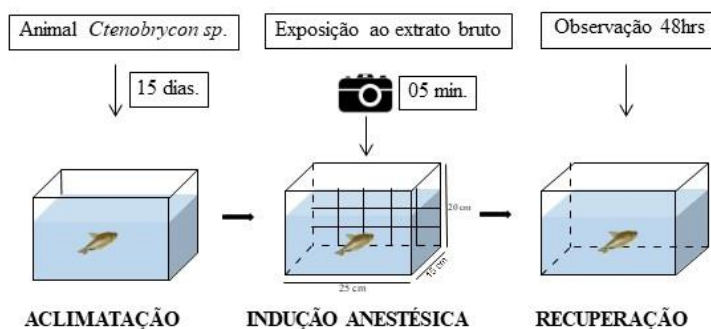
### 2.4 Análises físico-químicas da água

As análises físico-químicas da água foram realizadas para cada tratamento antes do início do experimento. Foram utilizados: termômetro para aferir a temperatura e testes de nitrito, amônia toxica, oxigênio dissolvido, dureza total e pH.

### 2.5 Indução anestésica e avaliação do comportamento

A indução anestésica foi conduzida por método de imersão dos animais em aquários contendo 5 litros de água, continuamente aerados e monitorados por filmadora (Sony - Modelo: DCR DVD610) durante cinco minutos de acordo com o trabalho de Marking & Meyer (1985), de acordo com o esquema representado na **figura 1**. Após a anestesia, os animais passaram por procedimentos de biometria, como, pesagem e aferição do comprimento total e padrão. Em seguida, foram transferidos individualmente aos aquários de recuperação, onde é registrado o tempo de retorno à natação normal. O tempo de recuperação foi cronometrado imediatamente após a retirada do animal do aquário de indução. Foram utilizados cinco espécimes de peixes para cada tratamento. O controle positivo foi feito com Eugenol (diluído em álcool 70%) e o controle negativo com álcool 70%.

**Figura 1** – Representação esquemática de indução anestésica ao extrato alcoólico.



Os vídeos de cada animal foram analisados individualmente para monitoramento dos estágios de anestesia e/ou comportamento convulsivo, de acordo com as tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1** – Comportamento dos animais em anestesia.

Estágios	Anestesia	Comportamento
1	Sedação leve	Perda de reação aos movimentos visuais e ao toque
2	Anestesia leve	Perda parcial do equilíbrio
3	Anestesia profunda	Perda total do equilíbrio
4	Anestesia cirúrgica I	Diminuição dos movimentos operculares
5	Anestesia cirúrgica II	Movimento mínimo opercular, o peixe fica estático
6	Colapso medular	Overdose (dose em excesso) ou tempo excessivo de anestesia

**Fonte:** Ross e Ross, (1999).

**Tabela 2** – Estágios do padrão comportamental durante crise epiléptica

Escores	Comportamento
0	Nado curto
1	Aumento na atividade natatória e na abertura opercular
2	Movimento erráticos e acelerados
3	Movimentos circulares
4	Convulsão clônica
5	Convulsão tônica
6	Morte

**Fonte:** Mussulini et al. (2013).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Efeito anestésico dos extratos de jambú *Spilanthes acmella* e João brandinho *Piper calossum* em zebrafish *D. rerio* e em tetra prata *Ctenopoma* sp.

Espécie-alvo	Tratamento	Concentração (ml/L)	Órgão da planta	Espécimes utilizados (n)	Tempo médio de anestesia (min.)	Tempo médio de recuperação (min.)	Mortalidade
Zebrafish <i>D. rerio</i>	Eugenol	1	-	3	1.03	5	0
	Extrato de Jambú 1:1	2	Folha	3	*	*	0
		2	Flor	3	2.31	-	3
	Extrato de Jambú 1:5	2	Flor	3	3.33	2.56	1
	João brandinho 1:1	2,5	Folha	3	3.32	5.08	1
			João brandinho 1:5	1	Folha	3	2.33

	Álcool 70%	1	-	3	*	*	0
	Eugenol	2,5	-	3	2.50	3.31	0
Tetra prata <i>Ctenobrycon</i> sp.	Jambú 1:1	2,5	Folha	3	*	*	0
	João brandinho 1:1	8	Folha	3	3.44	1.34	0
	Álcool 70%	1	-	3	*	*	0

Barbas et al., (2016) já comprovou que as inflorescências de *S. acmella* são eficazes como anestésico para a espécie de peixe tambaqui *Colossoma macropomum*, Vilhena et al., (2019) também confirmou a eficácia da anestésica do óleo essencial de *Piper divaricatum* para tambaqui *C. macropomum*. Diversos trabalhos com anestésicos de base vegetal (Zon & Peterson, 2005; Roohi & Imanpoor, 2015; Barbas et al., 2016; Romaneli et al., 2018; Can, Kızak, Can, & Özçiçek, 2019) utilizando a molécula isolada demonstraram ser eficazes para peixes. Estes agentes naturais podem diminuir os danos aos animais, além de diminuir o estresse quando comparado com anestésico sintético (Fenn et al., 2013). Em nossos experimentos o Eugenol induziu anestesia nos dois espécimes dentro do tempo considerado ideal (03 minutos) (Marking & Meyer, 1985), assim como a recuperação (05 minutos), ideal para realização de biometria, procedimentos mais invasivos e manejo seguro. Para a espécie Tetra de prata o extrato de João brandinho foi eficaz como anestésico na dosagem utilizada, assim como o extrato das folhas de jambu em Zebrafish. O álcool 70% não causou nenhum efeito colateral nos animais. Os extratos de flores de Jambú e folhas de João brandinho nas concentrações utilizadas foram letais, causando comportamento tipo convulsivo, semelhante ao trabalho de Mussulini et al. (2013). Trabalhos confirmam que o spilanthol (Ramsewak, Erickson, & Nair, 1999), molécula responsável pelo efeito anestésico está em maior concentração nas inflorescências e, portanto, nós sugerimos que o extrato nesta dosagem foi tóxico, causando 100% de mortalidade nestes grupos, de acordo com o protocolo da OCDE (Fish, acute Toxicity Testing) N°203, dosagens de substâncias que causam alta mortalidade é considerada tóxica ao organismo. Todavia, este é o primeiro trabalho a mostrar o efeito anestésico e analgésico de extratos brutos para peixes. Isso é uma grande vantagem, visto que sua produção é fácil e não necessita de equipamentos caros e profissionais especializados. Tudo isso viabiliza a utilização desses extratos por pequenos produtores, garantindo a segurança durante o manejo e procedimentos mais invasivos.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados preliminares mostram que o extrato bruto de plantas nativas tem efeito anestésico e pode ser um possível indutor epilético para peixes amazônicos. Com isso esperamos estabelecer um protocolo de anestesia e definir se de fato os extratos de flores jambú e folhas de João brandinho causam crise epilética em peixes. Visto que o genoma do zebrafish apresenta 70% de analogia ao dos seres humanos poderemos fazer uma analogia do uso dessas plantas pelos seres humanos.

#### REFERÊNCIAS

- Broom, D. M. (2014). *Sentience and animal welfare*. Wallingford: CABI.
- Barbas, L. A. L., Hamoy, M., de Mello, V. J., Barbosa, R. P. M., de Lima, H. S. T., Torres, M. F., ... & Gomes, M. R. F. (2017). Essential oil of citronella modulates electrophysiological responses in tambaqui *Colossoma macropomum*: A new anaesthetic for use in fish. *Aquaculture*, 479, 60-68.
- Barbas, L. A. L., Stringhetta, G. R., Garcia, L. de O., Figueiredo, M. R. C., & Sampaio, L. A. (2016). Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. *Aquaculture*, 456, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.026>.