

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Leandro Pergher Bolzan

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM NEROLIDOL
MELHORA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS MUSCULARES DE *Brycon amazonicus*
EXPOSTOS A ESTRESSE POR CALOR**

Santa Maria, RS
2023

Leandro Pergher Bolzan

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM NEROLIDOL
MELHORA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS MUSCULARES DE *Brycon amazonicus*
EXPOSTOS A ESTRESSE POR CALOR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção de título de mestre em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Dellaméa Baldissera
Co-orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

Santa Maria, RS
2023

LEANDRO PERGHER BOLZAN

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM NEROLIDOL MELHORA A
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS
MUSCULARES DE *Brycon amazonicus* EXPOSTOS A ESTRESSE POR CALOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Farmacologia

Aprovado em 21 de março de 2023

Matheus Dellaméa Baldissera, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr (UFSM)
(por parecer)

Francielle Liz Monteiro, Dra (UFN)
(por videoconferência)

Santa Maria, RS

2023

RESUMO

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM NEROLIDOL MELHORA A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS MUSCULARES DE *Brycon amazonicus* EXPOSTOS A ESTRESSE POR CALOR

AUTOR: Leandro Pergher Bolzan

ORIENTADOR: Matheus Dellaméa Baldissera

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

A aquacultura desempenha um papel importante no fornecimento de alimentos para uma população mundial em crescimento, sendo os peixes um alimento importante na dieta humana ao longo da história. No entanto, o aumento da temperatura das águas é um fator preocupante, uma vez que a temperatura é um fator ambiental chave que determina o crescimento de espécies-chaves da aquicultura, como o matrinxã (*Brycon amazonicus*). O uso de extrativos vegetais tem sido considerada uma interessante abordagem para evitar/reduzir os efeitos negativos da exposição a temperaturas elevadas da água, como o nerolidol, que apresenta atividade antioxidante quando adicionado a dieta para peixes. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar se a suplementação dietética com nerolidol previne ou reduz o dano oxidativo muscular e o comprometimento do perfil de ácidos graxos no filé de matrinxãs expostos ao estresse por calor. Setenta e dois matrinxãs foram transferidos para 12 tanques e divididos em quatro grupos: dieta basal, dieta contendo nerolidol, dieta basal exposto ao estresse térmico, e dieta contendo nerolidol exposto ao estresse térmico. Os grupos dieta basal e dieta basal expostos ao estresse térmico receberam a dieta basal (sem nerolidol), enquanto os grupos dieta contendo nerolidol e dieta contendo nerolidol exposto ao estresse térmico receberam a dieta basal suplementada com 1,0 mL de nerolidol/kg de ração por 14 dias. Após 14 dias de dieta, os grupos dieta basal expostos ao estresse térmico e dieta contendo nerolidol exposto ao estresse térmico foram submetidos a estresse térmico a 34 °C por 72 h. Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica (LPO) no plasma e no músculo foram significativamente maiores em peixes expostos ao estresse térmico em comparação com peixes não expostos ao estresse térmico, enquanto as atividades da superóxido dismutase (SOD) e da glutatona peroxidase (GPx) foram significativamente menores nestes tecidos. O conteúdo total de ácidos graxos saturados (SFA) no filé foi significativamente maior em peixes expostos ao estresse térmico em comparação com peixes não expostos ao estresse térmico, enquanto o teor total de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) foi significativamente menor. O nerolidol adicionado a dieta preveniu o aumento dos níveis de LPO muscular e dos níveis plasmáticos de EROs e LPO em peixes expostos ao estresse térmico, e parcialmente preveniu o aumento dos níveis de EROs musculares. A suplementação com nerolidol preveniu a inibição da atividade da GPx muscular em peixes expostos ao estresse térmico, e preveniu parcialmente a diminuição da atividade da GPx plasmática. O nerolidol suplementado a dieta preveniu o aumento de SFA do filé em peixes expostos ao estresse térmico, ao mesmo tempo em que preveniu parcialmente a diminuição de PUFA. Por fim, corroboramos os dados que o estresse térmico a 34 °C por 72 h causa danos oxidativos e altera o perfil de ácidos graxos do filé do matrinxã, e concluímos que a dieta contendo 1.0 mL de nerolidol/kg de ração por 14 dias pode ser considerada uma estratégia para prevenir danos oxidativos induzidos pelo estresse térmico e comprometimento do perfil de ácidos graxos musculares.

Palavras-chave: aquacultura; estresse oxidativo; extrativo vegetal; dieta; mudanças climáticas; sesquiterpeno

ABSTRACT

DIETARY SUPPLEMENTATION WITH NEROLIDOL IMPROVES THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND MUSCLE FATTY ACID PROFILE OF *Brycon amazonicus* EXPOSED TO ACUTE HEAT STRESS

AUTHOR: Leandro Pergher Bolzan

ADVISOR: Matheus Dellaméa Baldissera

CO-ADVISOR: Profa. Dra. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

Aquaculture plays an important role in providing food for a growing world population, with fish being an important food item in the human diet throughout history. However, the increase in water temperature is a worrying factor, since temperature is a key environmental factor that determines the growth of key aquaculture species, such as matrinxã (*Brycon amazonicus*). The use of plant extracts has been considered an interesting approach to avoid/reduce the negative effects of exposure to high water temperatures, such as nerolidol, which has antioxidant activity when added to fish diets. Thus, the aim of this study was to determine whether dietary supplementation with nerolidol prevents or reduces muscle oxidative damage and compromised the fatty acid profile in fillet from matrinxãs exposed to heat stress. Seventy-two matrinxãs were transferred to 12 tanks and divided into four groups: basal diet; diet containing nerolidol; basal diet exposed to heat stress, and diet containing nerolidol exposed to heat stress. The basal diet and basal diet exposed to heat stress groups received the basal diet (without nerolidol), while the nerolidol-containing diet and nerolidol-containing diet exposed to heat stress groups received the basal diet supplemented with 1.0 mL of nerolidol/kg of ration for 14 days. After 14 days of diet, the basal diet exposed to heat stress and the nerolidol-containing diet exposed to heat stress groups were subjected to heat stress at 34 °C for 72 h. The levels of espécies reativas de oxigênio (EROs) and peroxidação lipídica (LPO) in plasma and muscle were significantly higher in fish exposed to heat stress compared to fish not exposed to heat stress, while the activities of superóxido dismutase (SOD) and of glutationa peroxidase (GPx) were significantly lower in these tissues. The total of ácidos graxos saturados (SFA) content in the fillet was significantly higher in fish exposed to heat stress compared to fish not exposed to heat stress, while the total ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) content was significantly lower. Nerolidol added to the diet prevented the increase in muscle LPO levels and plasma EROs and LPO levels in fish exposed to heat stress, and partially prevented the increase in muscle ROS levels. Nerolidol supplementation prevented the inhibition of muscle GPx activity in fish exposed to heat stress, and partially prevented the decrease in plasma GPx activity. Nerolidol supplemented the diet prevented the increase in fillet SFA in fish exposed to heat stress, while partially preventing the decrease in PUFA. Finally, we corroborate the data that heat stress at 34 °C for 72 h causes oxidative damage and changes the fatty acid profile of matrinxã fillet, and we conclude that the diet containing 1.0 mL of nerolidol/kg of feed for 14 days can be considered a strategy to prevent oxidative damage induced by heat stress and impairment of muscle fatty acid profile.

Key-words: aquaculture; oxidative stress; vegetable extractive; diet; climatic changes; sesquiterpene.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1. Centesimal and calculated compositions of fish diet.....55

Table 2. Total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA), omega 3 (n3), omega 6 (n6), and omega 9 (n9) in the fillet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress.....56

Table 3. Fillet fatty acid profile (g/kg) of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress.....57

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

FIGURA 1 – Adulto de matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>)	19
FIGURA 2 - Padrões espaciais da ameaça das mudanças climáticas.....	20
FIGURA 3 - Estruturas químicas dos dois enantiômeros e isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> do nerolidol	27

Artigo

FIGURE 1- Plasma reactive oxygen species (ROS) [A] and lipid peroxidation (LPO) [B] levels, and superoxide dismutase (SOD) [C] and glutathione peroxidase (GPx) [D] activity of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress. Bars that do not share a common superscript letter differ significantly using two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; n = 6 per group)59

FIGURE 2 - Muscle reactive oxygen species (ROS) [A] and lipid peroxidation (LPO) [B] levels, and superoxide dismutase (SOD) [C] and glutathione peroxidase (GPx) [D] activity of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed with a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress. Bars that do not share a common superscript letter differ significantly using two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; n = 6 per group)60

BOLZAN, LEANDRO PERGHER

Atividade antioxidante de uma dieta contendo nerolidol em matrinxãs (*Brycon amazonicus*) expostos ao estresse por calor / LEANDRO PERGHER BOLZAN.- 2023.
68 p.; 30 cm

Orientador: MATHEUS DELLAMÉA BALDISSERA

Coorientadora: Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2023

1. *Brycon amazonicus* 2. Peixes 3. ESTRESSE POR CALOR
I. BALDISSERA, MATHEUS DELLAMÉA II. Duarte, Marta Maria Medeiros Frescura III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LEANDRO PERGHER BOLZAN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	AQUACULTURA E MATRINXÃ (<i>Brycon amazonicus</i>).....	18
2.2	MUDANÇAS CLIMÁTICAS ASSOCIADA AO AUMENTO DA TEMPERATURA DA ÁGUA E OS IMPACTOS NA SOBREVIVÊNCIA DE PEIXES DE ÁGUA DOCE.....	19
2.3.	ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS), ESTRESSE OXIDATIVO, DANO OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO	21
2.3.1	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	21
2.3.2	Estresse oxidativo, dano oxidativo e sistema de defesa antioxidante enzimático.....	22
2.4.	ÁCIDOS GRAXOS	24
2.5.	ÓLEOS ESSENCIAIS E NEROLIDOL.....	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	29
5	REFERENCIAS	61

APRESENTAÇÃO

Os itens **INTRODUÇÃO e REFERENCIAL TEÓRICO** apresentam uma detalhada revisão bibliográfica acerca dos temas abordados nesta dissertação. O presente trabalho originou um **ARTIGO CIENTÍFICO**, o qual englobam os itens: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. O trabalho está formatado em conformidade com o periódico a que foi publicado (Journal of Thermal Biology). O item **REFERÊNCIAS** reporta-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Referencial teórico.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o peixe é considerado um alimento básico importante na dieta humana por ser uma fonte interessante de vitaminas, minerais, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (OSMOND E COLOMBO, 2019; GRGEC, 2022), os quais são vistos como parte de uma dieta saudável. Atualmente, a aquacultura é o setor de produção de animais que mais cresce no mundo, e deve se expandir ainda mais para atender a um crescente aumento da população global que deverá chegar a 9,3 bilhões até 2050 (UNITED UNIONS, 2017). No Brasil, o consumo de pescado aumentou exponencialmente nos últimos anos, uma vez que a população passou a conhecer melhor seus benefícios nutricionais (CRUZ et al, 2021), inclusive o consumo do matrinxã (*Brycon amazonicus*), um dos mais importantes peixes cultivados e comercializados na Amazônia (OLIVEIRA et al, 2012; FERREIRA et al, 2021) e uma das espécies mais produzidas no Brasil (SANTOS et al., 2006). No entanto, as atuais tendências globais da produção aquícola estão ameaçadas pelas mudanças climáticas, na sua maior parte relacionada a fontes antropogênicas (ALFONSO et al, 2021).

Embora seja o setor de produção de animais que mais cresce no mundo, a aquacultura apresenta uma série de desafios que afetam sua produção, podendo ser destacado o estresse térmico causado pela elevação da temperatura das águas (MUGWANYA et al, 2022; PHILLIP et al, 2022). O aquecimento global antropogênico já está mudando nosso meio ambiente com consequências devastadoras e os efeitos em espécies de aquicultura, não estão recebendo atenção. Os peixes são organismos ectotérmicos cuja temperatura corporal varia de acordo com as mudanças na temperatura ambiental (ALFONSO et al, 2021). Neste sentido, a temperatura é o principal fator determinante do crescimento e sobrevivência dos organismos aquáticos, pois afeta diretamente sua imunidade, taxa metabólica e demanda de oxigênio, podendo culminar com a morte dos mesmos (DAWOOD, 2021). De acordo com o relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC, 2014), o sul da Europa está entre as regiões esperadas que tenham o aquecimento global mais severo com temperaturas do ar variando de 4 a 7 °C até 2100 na Península Ibérica (MADEIRA et al, 2016). Mais especificamente, os modelos de mudanças climáticas preveem um aumento nas temperaturas das águas tropicais chegando a 3°C para o próximo século (GANACHAUD et al, 2011; CAMPOS et al, 2019), 34°C no Mediterrâneo e 23 °C nas águas portuguesas (MADEIRA et al, 2016).

Na região Amazônica, em decorrência dos desmatamentos da floresta Amazônica, a temperatura ambiental poderá aumentar de 4 a 6 °C (MARENGO, 2009; MACEDO et al, 2013) o que contribui para o aquecimento das temperaturas das águas Amazônicas. Neste sentido, as projeções de aumento da temperatura global vêm ganhando destaque na comunidade científica, pois a oscilação térmica das águas é um ponto crítico que atinge seriamente a fisiologia dos peixes.

Uma das consequências da exposição ao estresse térmico causado pela elevação da temperatura da água é o estresse oxidativo e/ou dano oxidativo (BALDISSERA et al, 2020a; DAWOOD et al, 2022), como observado em matrinxãs expostos por 72h a 34°C (BALDISSERA et al, 2020a). O estresse oxidativo são alterações reversíveis do estado redox dos compartimentos celulares que podem afetar o status antioxidante, mas que não é capaz de causar danos moleculares e celulares, precedendo um possível dano oxidativo (SIES, 2015). Por outro lado, o dano oxidativo ocorre quando passam a existir danos moleculares e celulares aos lipídeos e proteínas, causando perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (VINÃ et al, 2018). Recentemente, um estudo conduzido por Baldissera e colaboradores (2020a) revelou que o estresse térmico (exposição a 34°C) causa estresse oxidativo plasmático e muscular, e que o sistema de defesa enzimático e não enzimático são incapazes de prevenir o dano oxidativo. Com isso, surge a necessidade de estratégias que possam reduzir ou prevenir o quadro de dano oxidativo causado pelo estresse térmico, como o uso de extrativos vegetais e seus derivados (DINARDO et al, 2021).

Dietas enriquecidas com plantas podem representar uma estratégia eficaz para aumentar o *status* antioxidante dos peixes e a resistência frente a desafios da aquicultura (DINARDO et al, 2021) como o uso do nerolidol BALDISSERA e colaboradores (2020b). O nerolidol (C₁₅H₂₆O) (3,7,11- trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas como neroli (*Citrus aurantium*), gengibre (*Zingiber officinale*), chá da árvore (*Melaleuca alternifolia*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (AZZI et al., 2018), sendo comumente utilizado devido sua capacidade antioxidante (IQUBAL et al, 2019; BASTAKI et al, 2021). Estudos utilizando o nerolidol isolado na dieta de peixes são escassos. No entanto, Baldissera e colaboradores (2020b) evidenciaram que a suplementação dietética com 1,0 mL de nerolidol/kg de dieta durante 60 dias demonstrou significativo efeito antioxidante no músculo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio, bem como através do aumento da atividade muscular da catalase. Diante disto, acreditamos que a suplementação possa prevenir ou reduzir o quadro de estresse oxidativo em matrinxãs expostos ao estresse por calor.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AQUACULTURA E MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

A aquicultura mundial é o setor de produção animal que vem apresentando o maior índice de crescimento nas últimas décadas, onde a produção global de peixes foi estimada em 179 milhões de toneladas em 2018, sendo responsável por 46% da produção total e 52% de peixe para consumo humano. Além disso, é importante enfatizar que o consumo global de peixes vem aumentando em uma taxa média anual de 3,1% de 1961 a 2017, o que é superior ao de todos os outros alimentos proteicos de origem animal, os quais vêm crescendo 2,1% ao ano (carne, leite e laticínios). Por fim, é interessante ressaltar que o consumo *per capita* de peixe cresceu de 9,0 kg (peso vivo equivalente) em 1961 para 20,5 kg em 2018, ou seja, 1,5% ao ano (SANTOS D. FILHO e DA BATISTA, 2009; ALÉXIS et al, 2010; ZANUZZO et al, 2018).

De acordo com Osmond e Colombo (2019), a carne de peixe é considerada um alimento saudável que fornece proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais essenciais à saúde humana, o que explica o crescente aumento no consumo de pescado. Além da proteína, o peixe também é uma fonte rica em ácidos graxos benéficos a saúde humana, especialmente os ácidos graxos poliinsaturados ômega (ω) -3, o que também corrobora o crescente aumento do consumo de carne de peixe. Neste sentido, destacamos o *Brycon amazonicus*, que é uma das espécies mais abundantes, produzidas e consumidas na Bacia Amazônica (MOHANTY et al, 2019).

O *B. amazonicus* (Figura 1), conhecido popularmente como matrinxã (região central da Amazônia) ou Jatuarana (bacia do Rio Madeira) é uma espécie neotropical, migratória e onívora distribuída ao longo do Rio Solimões-Amazonas e tributários, na bacia do rio Orinoco e no rio Essequibo na Venezuela (DOS SANTOS FILHO e DA BATISTA, 2009; ZANUZZO et al, 2018; LIMA et al, 2021). Esta espécie apresenta elevado potencial zootécnico (rápido crescimento, boa conversão alimentar e facilidade de reprodução induzida), alto valor comercial e sua carne é altamente apreciada, o que tem despertado o interesse dos piscicultores (TORTOLERO et al, 2010; LIMA et al, 2021). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 3.590 toneladas de matrinxã no ano de 2020, sendo a região norte responsável por mais de 91% da produção total de matrinxã o que corrobora a importância da espécie para a piscicultura e consumo (IBGE, 2020).

Figura 1 – Adulto de matrinxã (*Brycon amazonicus*)



Fonte: SOARES et al. (2008).

Contudo, a sobrevivência e o avanço da produção de peixes de água doce enfrentam uma série de ameaças, como as relacionadas as mudanças climáticas (BARBAROSSA et al, 2021), tendo o aumento da temperatura das águas o foco deste estudo. Recentemente, estudo conduzido por De Barros e colaboradores (2019) revelou que a matrinxã é uma espécie pouco tolerante á águas com temperaturas elevadas, concluindo que temperaturas próximas a 24°C causaram um aumento da taxa de sobrevivência desta espécie a médio e longo prazo. Neste sentido, um aumento expressivo na temperatura das águas da região Amazônica pode ser considerado um importante fator de risco para a manutenção, reprodução e sobrevivência da espécie.

2.2 MUDANÇAS CLIMÁTICAS ASSOCIADAS AO AUMENTO DA TEMPERATURA DA ÁGUA E OS IMPACTOS NA SOBREVIVÊNCIA DE PEIXES DE ÁGUA DOCE

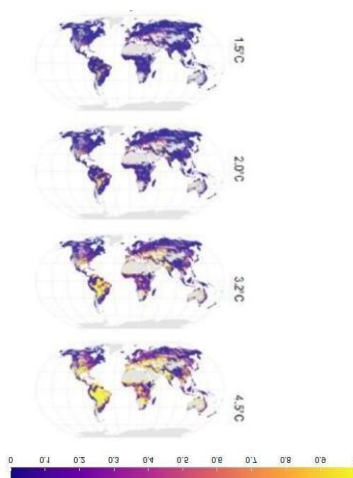
Os habitats de água doce são desproporcionalmente biodiversos. Enquanto 0,8 % da superfície da terra é coberta por água doce, a mesma hospeda aproximadamente 15.000 espécies de peixes, o que corresponde aproximadamente metade da diversidade global de peixes conhecida (DUDGEON et al, 2006; TEDESCO et al, 2017). Os habitats de água doce também estão ameaçados por atividades humanas e mudanças ambientais, que resultaram em declínios substanciais na biodiversidade das água nas últimas décadas (BUTCHART, 2010). Em meio às pressões humanas sobre os ecossistemas de água doce (incluindo captação de água, desvio, represamento e poluição), é esperado que as mudanças climáticas antropogênicas se tornem cada vez mais importantes neste cenário (URBAN, 2015).

As mudanças climáticas representam uma ameaça à biodiversidade global, incluindo no ecossistema da Região Amazônica. Estudo conduzido por Latini e colaboradores (2021) revelou que a biodiversidade está rapidamente diminuindo nos ecossistemas de água doce do Brasil devido a ações do governo brasileiro, como: (1) promoção de cortes orçamentários regulares nas áreas científicas, social e de fundos ambientais, e (2) incentivo ao cultivo de

espécies invasoras não nativas (*Tilapia rendalli*), que intensifica a eutrofização, competição e introdução de patógenos. Além destes fatores, o aumento da temperatura das águas também tem sido considerado um importante problema na sobrevivência da biodiversidade aquática, incluindo os peixes (BARBAROSSA et al, 2021).

No interesse particular deste estudo, Barbarossa e colaboradores (2021) revelaram que os peixes de água doce foram amplamente ignorados nas avaliações das mudanças climáticas, o que nos traz grande preocupação em relação a sua sobrevivência. Os autores demonstraram, através de um estudo prospectivo alguns padrões de exposição a extremos climáticos projetados, como exposto a seguir: (1) um cenário sem política de mitigação das mudanças climáticas (+ 4, 5 °C mais elevado que os níveis atuais) resultaria em pelo menos metade da área geográfica ameaçada por extremos climáticos, afetando 63% das espécies de peixes de água doce; (2) aumentos de 3,2 °C, 2,0 °C e 0,2 °C na temperatura além dos níveis atuais afetaria 36%, 9% e 2% das espécies de peixes de água doce respectivamente, revelando que o aumento das temperaturas das águas afeta diretamente os peixes de água doce (Figura 2). Diante disso, os autores concluem que é importante intensificar acordos internacionais para mitigar o aquecimento global e assim proteger a biodiversidade de água doce.

Figura 2 - Padrões espaciais da ameaça das mudanças climáticas



Fonte: Adaptado de Barbarossa et al. (2021).

Através de modelos computacionais, alguns estudos antecipam que se as emissões dos gases do efeito estufa continuarem a crescer, a atmosfera do nosso planeta sofrerá consideráveis alterações ainda neste século. Na região Amazônica, em decorrência dos desmatamentos da floresta Amazônica, a temperatura ambiental poderá aumentar de 4 a 6 °C

(MARENGO et al, 2009; MACEDO et al, 2013) o que contribui para o aquecimento das temperaturas das águas Amazônicas. Esse rápido desmatamento da floresta e o consequente aumento das temperaturas aquáticas tem sido associado a várias alterações na fisiologia dos peixes da Amazônia, como observado no *Pyrrhulina brevis*, *Apistograma agassizi* e *Hyphessobrycon melazonatus*, incluindo o matrinxã (CAMPOS et al, 2019; BALDISSERA et, 2020a).

O aumento da temperatura global está entre os fatores ambientais mais importantes ligados às mudanças na fisiologia e bioquímica dos peixes, incluindo as espécies que habitam a Amazônia (BĂNĂDUC et al, 2020). Grande parte dos animais necessitam manter sua temperatura corporal dentro de uma faixa relativamente estreita. Como os peixes são ectotérmicos, a temperatura da água reflete a sua temperatura corporal, fazendo com que exista uma dependência de fontes externas de calor. Desta forma, os peixes são suscetíveis aos efeitos prejudiciais da elevação térmica da água, que se manifesta em disfunções no crescimento, metabolismo, imunidade, reprodução e sobrevivência, bem como distúrbios no equilíbrio antioxidante/oxidante muscular e perfil de ácidos graxos (BALDISSERA et al, 2020a).

2.3. ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS), ESTRESSE OXIDATIVO, DANO OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Em um contexto geral, todas as espécies químicas constituídas de um átomo ou associação deles, que possuem um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa, é denominado radical livre. Esse elétron torna o átomo altamente instável cineticamente e energeticamente, fazendo com que ele necessite doar ou receber elétrons de outras moléculas para se estabilizar (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2018; VIÑA et al, 2018). Em organismos aeróbicos, o oxigênio molecular (O_2) é classificado como não reativo e não tóxico relativamente, tendo em vista que os seus elétrons da camada externa são estáveis. Aproximadamente 90% dele é consumido e reduzido diretamente à água. Este processo, ocorre com o auxílio da enzima citocromo oxidase por meio de mecanismos de quatro elétrons sem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (JOY et al, 2017).

Entretanto, o oxigênio remanescente, é convertido em radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que por sua vez, é reduzido a um elétron com aceitação concomitante de dois prótons para

formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta molécula é capaz de aceitar mais um elétron divide-se em radical hidroxila (OH^\bullet) e ânion hidroxila (OH^-) O OH^\bullet é um dos oxidantes mais potentes em sistemas biológicos, sendo altamente reativo (SEIFRIED et al, 2007). O processo de oxidação é primordial no metabolismo celular, pois, ocorre de maneira natural nas mitocôndrias, membrana, citoplasma, enzima do citocromo P450. Os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio executam importantes funções, pois podem agregar se a átomos (hidrogênio ou íons metálicos), bem como moléculas de açúcar, proteínas e lipídeos. A formação de radicais livres desenvolve no organismo uma série de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, como a atuação de enzimas e não-enzimas do sistema de defesa antioxidante (LUSHCHAK, V. I. e BAGNYUKOVA, 2006; LUSHCHAK, 2011).

2.3.2 Estresse oxidativo, dano oxidativo e sistema de defesa antioxidante enzimático

O estresse oxidativo é considerado como alterações reversíveis do estado redox dos compartimentos celulares que podem afetar o status antioxidante, mas que não é capaz de causar danos moleculares e celulares (como peroxidação lipídica, dano proteico e alterações no DNA). O estresse oxidativo, por definição, é decorrente de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo os primeiros e conduzindo a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (SIES, 2015). O estresse oxidativo pode ser resultante de um ou mais de um dos seguintes três fatores: (1) aumento na geração de EROs; (2) prejuízo do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos); (3) incapacidade para reparar o dano oxidativo. Em resumo, o estresse oxidativo é um quadro reversível (ALY et al, 2010).

Por outro lado, o dano oxidativo ocorre quando passam a existir danos moleculares e celulares. Em suma, o estresse oxidativo precede o dano oxidativo que ocorre quando os sistemas redutores não conseguem lidar com a taxa de oxidação dos componentes celulares (VIÑA et al, 2018). A instalação desse processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, ocasionando o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. No interesse particular deste estudo, a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) das membranas que causa à formação de radicais livres capazes de modificar a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas, sendo a LPO uma das principais consequências do estresse oxidativo

(FRANÇA et al, 2013; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2018). Os lipídios oxidados afetam a função celular acumulando-se na membrana, causando interferência na função de muitos receptores ligados à membrana, o que causa alterações na fisiologia dos peixes (SEIFRIED et al, 2007).

Os tecidos dos peixes são constituídos por uma alta concentração de PUFA que favorecem a manutenção da fluidez das membranas desses animais durante alterações na temperatura da água. No entanto, os PUFA são altamente sensíveis aos efeitos dos radicais livres, o que pode causar sua oxidação (MONSERRAT et al, 2003). Recentemente, estudo conduzido por Campos e colaboradores (2019) observou a ocorrência de danos lipídicos em decorrência da produção excessiva de EROs em duas espécies de peixes amazônicos (*A. agassizii* e *H. melazonatus*) expostas a um cenário climático extremo (temperatura da água a 30,5 °C) quando comparado a um cenário climático observado atualmente (temperatura da água a 26,5 °C), o que corrobora os potentes efeitos negativos do aumento da temperatura da água na saúde dos peixes. Além disso, estudo conduzido por Joy e colaboradores (2017) relataram que o estresse por calor (38 °C) causa danos lipídicos no músculo do *Etiropus suratensis* após 24, 48 e 72 h de exposição, concluindo que temperatura elevada da água causa danos oxidativo significativo ao músculo do peixe.

No interesse em particular do estudo, Baldissera e colaboradores (2020a) relataram que o *B. amazonicus* quando exposto ao estresse térmico agudo (32°C e 34°C) apresenta um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante, o que resulta na indução de danos nas células musculares do peixe, sugerindo que o sistema de defesa não é capaz de suprir o estresse causado pelas altas temperaturas. Este estudo revelou que ocorre uma inibição de parâmetros antioxidantes enzimáticos, bem como depressão da capacidade antioxidante não enzimática, seguido por superprodução de EROS e danos aos lipídios.

2.4. ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são os componentes estruturais fundamentais de quase todas as formas de lipídeos, atuando como precursores de moléculas bioativas. Nos peixes, os ácidos graxos estão envolvidos no processo de fornecimento de energia, absorção e transporte de vitaminas lipossolúveis, e síntese de matérias-primas para certos hormônios e vitaminas (TURCHINI; TORSTENSEN; NG, 2009). Além disso, os ácidos graxos têm papéis estruturais e funcionais relacionados a reprodução e osmoregulação, bem como na resposta ao estresse, o que revela a importância destes na saúde dos peixes (ANACLETO et al, 2014).

Recentemente, estudos têm revelado que as alterações na temperatura da água influenciam na composição dos lipídeos da membrana plasmática, bem como na composição dos ácidos graxos do filé de peixe. Estudo conduzido por Ma e colaboradores (2015) revelou que juvenis de tilápias expostas a 34°C (grupo controle exposto a 22°C) durante 30 dias apresentaram alterações na composição de ácidos graxos musculares relacionados ao aumento do somatório total de ácidos graxos saturados, bem como a diminuição do somatório total de ácidos graxos polinsaturados (Σ SFA- *saturated fatty acids*). No interesse em particular deste estudo, Baldissera e colaboradores (2020a) revelou que juvenis de matrinxã expostas a temperatura de 34°C (grupo controle exposto a 28°C) durante 72 h apresentaram alterações na composição de ácidos graxos musculares relacionados ao aumento do total de SFA, bem como diminuição do somatório total de PUFA, alterações estão que podem ser explicados pela teoria da adaptação homeoviscosa descrita por Hazel (1995).

As membranas celulares são compostas por uma bicamada lipídica e uma variedade de proteínas que são altamente sensíveis a flutuações na temperatura da água. De acordo com Hazel (1995), os peixes neutralizam os efeitos das flutuações da temperatura da água sobre as propriedades de suas membranas celulares através da remodelação dos lipídeos das membranas, um processo que garante a manutenção das funções das membranas. Semelhante, Pernet e colaboradores (2007) relataram que os peixes neutralizam os efeitos das flutuações na temperatura ambiente e nas propriedades e função de suas membranas celulares, remodelando os lipídios da membrana, que envolve alterações na composição de ácidos graxos. Desta maneira, essas alterações na composição dos ácidos graxos podem ser consideradas um mecanismo de ajuste fisiológico dos peixes para manter as propriedades de suas membranas e, conseqüentemente suas funções. No entanto, essas alterações podem ser consideradas negativas a saúde do homem, ainda mais em um contexto global de alterações climáticas.

O peixe (incluindo peixes, crustáceos e moluscos) é um alimento saudável, cumprindo um papel crucial na segurança alimentar e nutricional global, sendo fonte valiosa de nutrientes essenciais para o homem (HICKS et al, 2019). Além disso, o peixe tem sido um alimento básico importante na dieta humana ao longo da história como uma fonte de baixa caloria de proteínas e micronutrientes de alta qualidade que beneficiam as funções fisiológicas vitais e a saúde geral ao longo da vida humana (KHALILI TILAMI ; SAMPELS, 2018; GRGEC, 2022). Além da proteína, o peixe também é uma rica fonte de óleos saudáveis, especialmente os *PUFAs*, onde existem duas famílias principais de *PUFAs* que são relevantes para a saúde humana, os *PUFAs* ômega-3 e ômega-6 (DJURICIC ; CALDER, 2021).

Os peixes são reputados como as fontes alimentares dominantes dos *PUFAs* de cadeia longa n-3 (ômega-3), como o ácido eicosapentoico (C20:5n-3) e o ácido docosa-hexaenoico (C22:6n-3), que são essenciais para a prevenção de doenças cardíacas, para o crescimento fetal, e para o desenvolvimento da visão e desenvolvimento neural (CALDER, 2018; MOHANTY et al, 2019; SPILLER et al, 2019), bem como efeitos positivos sobre a glicemia, controle do metabolismo lipídico e obesidade (FIGUEIREDO et al, 2017). Além disso, os peixes são fontes de *PUFAs* de cadeia longa n-6 (ômega-6), como o ácido linoleico (C18:2n-6 cis), que é considerado um importante aliado na redução do risco de doença cardiovascular (FROYEN; BURNS-WHITMORE, 2020).

De maneira geral, o consumo de *PUFAs* é considerado positivo a saúde humana, ao passo que o consumo excessivo de *SFAs* não traz benefícios, pois são relacionados a obesidade, aumento do risco de doença cardiovascular e aumento da resistência à insulina (FIGUEIREDO et al, 2017). Baseado nestas evidências, fica evidente que o aumento da temperatura das águas e sua consequente modificação no teor de ácidos graxos no filé do peixe pode impactar negativamente a saúde do homem. Desta maneira, o uso de compostos que possam prevenir ou reduzir essas alterações na composição dos ácidos graxos do filé pode ser considerado um aliado interessante, como o uso do nerolidol.

2.5. ÓLEOS ESSENCIAIS E NEROLIDOL

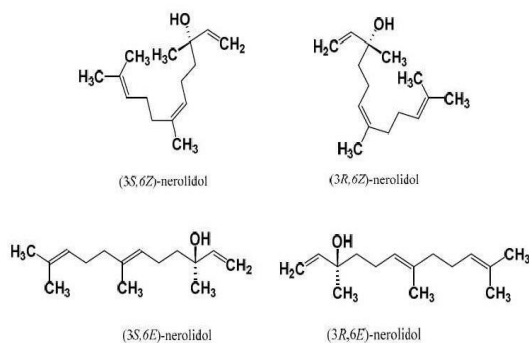
Através do seu metabolismo energético, as plantas dão origem aos óleos essenciais, que possuem um conjunto de compostos químicos (fitoquímicos) em sua composição. Por definição, os óleos essenciais são sistemas naturais e multicomponentes de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, as quais são obtidas a partir de matérias-primas vegetais (EDRIS, 2007; CARSON ; HAMMER, 2011). O uso de óleos essenciais tem sido amplamente utilizado na produção de diferentes espécies de peixes para redução de estresse causado pelo transporte (*Lippia sidoides* e *Mentha piperita*) e manejo (*Syzygium aromaticum*), bem como durante o estresse pelo aumento da temperatura da água (*Origanum vulgare*) (BARATA et al, 2016; MAGOUZA et al, 2022; BRANDÃO et al, 2022), que é o foco deste estudo.

O número de componentes de um óleo essencial geralmente varia de 20 a 200, e eles são nomeados de acordo com sua concentração na mistura, como (1) constituintes majoritários (de 20 a 95%), (2) constituintes secundários (1–20%) e (3) componentes vestigiais (abaixo de

1%) (STICHER, 2015). No geral, eles são classificados como hidrocarbonetos terpeno, simples e terpeno álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, ou mesmo compostos de enxofre (SWAMY et al, 2016). A utilização destes compostos isolados tem ganhado destaque especial na produção de peixes devido a suas atividades antibacterianas (linalol) (BANDEIRA JUNIOR et al, 2021) anestésicas (citral e linanol) (DE FREITAS SOUZA et al, 2019) redutoras de estresse durante o transporte (eugenol) (NAVARRO et al, 2016), e inclusive o nerolidol como promotor de crescimento (BALDISSERA et al, 2020b).

O nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol) é um sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas como neroli (*Citrus aurantium*), gengibre (*Zingiber officinale*), chá da árvore (*Melaleuca alternifolia*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sendo amplamente utilizado na produção de cosméticos, produtos de limpeza e também na indústria de alimentos como intensificador de sabor em alguns produtos (AZZI et al, 2018). Sua estrutura química apresenta quatro formas isoméricas distintas que consistem em dois enantiômeros e duas conformações geométricas isômeras. As isoméricas ocorrem devido à existência de uma ligação dupla na posição C-6 e o centro assimétrico C-3, como ilustrado na Figura 3 (CHAN et al, 2016).

Figura 3. Estruturas químicas dos dois enantiômeros e isômeros *cis* e *trans* do nerolidol.



Fonte: CHAN et al, (2016).

Tendo em vista que os compostos químicos pertencentes ao grupo sesquiterpeno são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, algumas pesquisas relatam que o nerolidol pode contrabalançar o efeito de EROs protegendo as células contra o dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA (IQUBAL et al, 2019; BASTAKI et al, 2021).

Um estudo conduzido por Türkmen e colaboradores (2022) em roedores, revelou que o tratamento com 100 mg/kg de nerolidol mitigou a nefrotoxicidade e a cardiotoxicidade causadas pela tioacetamida através da redução do dano lipídico e aumento na atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, sendo capaz de prevenir alterações histopatológicas nestes tecidos causadas pela tioacetamida. Além disso, estudo conduzido por Bastaki e colaboradores (2021) revelou que o tratamento oral com de 50 mg de nerolidol/kg/dia (por 14 dias) foi capaz de inibir o dano lipídico e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, bem como reduziu a perda de peso corporal e as lesões teciduais em um modelo de colite induzida por ácido acético, o que revela o potente efeito antioxidante do nerolidol em roedores.

Estudos utilizando o nerolidol isolado na dieta de peixes são escassos. No entanto, estudo conduzido por Baldissera e colaboradores (2020b) evidenciou que a suplementação dietética com 1,0 mL de nerolidol/kg de dieta durante 60 dias demonstrou significativo efeito antioxidante no músculo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio, uma molécula com potentes efeitos oxidativos. Além disso, esse mesmo estudo revelou que esta suplementação foi capaz de aumentar significativamente a atividade muscular da catalase, uma enzima do sistema de defesa antioxidante responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Por fim, estes mesmos autores concluíram que a suplementação com 1,0 mL de nerolidol/kg de dieta durante 60 dias foi capaz de reduzir o somatório total de SFAs, os quais em excesso são considerados negativos à saúde humana, cenário este que pode ter impactos nutricionais positivos para os consumidores. Diante disto, acreditamos que a suplementação dietética com 1,0 mL de nerolidol/kg de dieta possa prevenir ou reduzir o quadro de estresse oxidativo e o prejuízo no perfil de ácidos graxos em matrinxãs expostos ao estresse por calor.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi determinar se a suplementação dietética com nerolidol previne ou reduz o dano oxidativo muscular e o comprometimento do perfil de ácidos graxos dos matrinxãs expostos ao estresse por calor.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Formular uma dieta basal contendo todos os requerimentos nutricionais para juvenis de matrinxã, bem como adicionar 1.0 mL de nerolidol/kg de ração basal;

3.2.2. Avaliar os efeitos da dieta suplementada com 1.0 mL de nerolidol/kg de ração sobre parâmetros de crescimento, como: peso, comprimento total, peso do fígado, peso visceral, ganho de peso, crescimento específico, taxa de conversão alimentar, ingestão de ração, índice hepatossomático, índice vicerosomático, e sobrevivência;

3.2.3. Determinar os níveis plasmáticos e musculares de marcadores de estresse oxidativo (EROs e LPO), bem como a atividade de enzimas antioxidantes (SOD e GPx) em matrinxãs que receberam a dieta contendo nerolidol e expostos ao estresse por calor;

3.2.4. Quantificar o perfil de ácidos graxos musculares de matrinxãs que receberam a dieta contendo nerolidol e expostos ao estresse por calor.

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A produção científica inclui o artigo “Dietary supplementation with nerolidol improves the antioxidant capacity and muscle fatty acid profile of *Brycon amazonicus* exposed to acute heat stress” publicado no periódico *Journal of Thermal Biology* (fator de impacto 3.18) e está formatado de acordo com as normas exigidas pelo mesmo. Endereço de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103003>

Dietary supplementation with nerolidol improves the antioxidant capacity and muscle fatty acid profile of *Brycon amazonicus* exposed to acute heat stress

Leandro P. Bolzan^a, Danilo C. Barroso^{b,†}, Carine F. Souza^a, Fernanda C. Oliveira^c, Roger Wagner^c, Bernardo Baldisserotto^a, Adalberto L. Val^b, Matheus D. Baldissera^{a,*}

^a *Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil*

^b *LEEM—Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution, Brazilian National Institute for Research of the Amazon, Manaus, Amazonas, Brazil*

^c *Department of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil*

† *In memoriam*

*Author for correspondence: matheusd.biomed@yahoo.com.br (M.D. Baldissera).

ABSTRACT

An increase in water temperature in the Amazon River has elicited concerns about commercially important fish species associated with food security, such as matrinxã (*Brycon amazonicus*). Studies have demonstrated the positive effects of diets supplemented with plant-based products that combat heat stress-induced oxidative damage. The aim of this study was to determine whether dietary supplementation with nerolidol prevents or reduces muscle oxidative damage and impairment of the fillet fatty acid profile of matrinxã exposed to heat stress. Plasma and muscle reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO) levels were significantly higher in fish exposed to heat stress compared to fish not exposed to heat stress, while plasma superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity was significantly lower. The total content of saturated fatty acids (SFA) in fillets was significantly higher in fish exposed to heat stress compared to fish not exposed to heat stress, while the total content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was significantly lower. Nerolidol prevented the increase of muscle LPO and plasma ROS and LPO levels in fish exposed to heat stress, and partially prevented the increase in muscle ROS levels. Diets containing nerolidol prevented the inhibition of muscle GPx activity in fish exposed to heat stress, and partially prevented the decrease of plasma GPx activity. The nerolidol-supplemented diet prevented the increase of fillet SFA in fish exposed to heat stress, while partially preventing the decrease of PUFA. We conclude that acute heat stress at 34 °C for 72 h causes plasma and muscular oxidative damage, and that homeoviscous adaptation to maintain membrane fluidity can represent a negative impact for fish consumers. A nerolidol diet can be considered a strategy to prevent heat stress-induced oxidative damage and impairment of muscle fatty acid profiles.

Keywords: matrinxã; climate changes; water temperature; food security; oxidative damage; fish physiology.

1. Introduction

Freshwater fish have important subsistence, cultural, and economic value worldwide (Krabbenhof et al., 2020), exerting a crucial role in global food and nutritional security as a valuable source of essential nutrients (Hicks et al., 2019). Nevertheless, freshwater ecosystems are among the most threatened on the planet, with freshwater fish showing the highest extinction rate among vertebrates in the 20th century (Banaduc et al., 2020). Rising temperatures are among the most important environmental factors linked to modifications of fish physiology and biochemistry and constitute a significant concern for aquaculture and fisheries researchers, including for fish species that inhabit the Amazon (Jung et al., 2020). As ectothermic animals, fish are susceptible to the ill-effects of altered water temperature that manifest in perturbations of growth, metabolism, immunity, reproduction, and survival, as well as disruptions of muscle antioxidant/oxidant balance and fatty acid profile (Baldissera et al., 2020a). Many models of climate change have predicted an increase of tropical water surface temperature of up to 3 °C during the next century (IPPC et al., 2014). Some models predict temperature increases of between 3 and 5 °C for the Amazon region during this period, a condition that could be linked to rapid riparian deforestation in this region (Marengo, 2009; Macedo et al., 2013), while deforestation can also cool the Earth's temperature (Jiao et al., 2017). This rapid deforestation of the Amazonian forest has been associated with several alterations of Amazon fish physiology, as observed in *Pyrrhulina brevis*, *Apistogramma agassizi*, and *Hyphessobrycon melazonatus* (Campos et al., 2019), and matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Baldissera et al., 2020a).

Baldissera et al. (2020a) revealed that acute heat stress (exposure for 72 h to 34 °C) causes plasma and muscular oxidative stress, and that enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems are unable to prevent oxidative damage, contributing to impairment of health status in matrinxã. Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to disruption of redox signaling without damage to cellular molecules (such as lipid peroxidation or protein carbonylation). This may be considered a reversible process. However, when the redox state of cells becomes more reduced or the antioxidant system cannot cope with the rate of oxidation of cell components, there is an irreversible process known as oxidative damage (Gutteridge et al., 2018; Viña et al., 2018). To minimize or prevent the oxidative damage caused by excessive production of free radicals, mainly reactive oxygen species (ROS), the antioxidant defense system can be upregulated as a survival strategy to remove the ROS overproduction caused by heat stress (Cardoso et al., 2019). These mechanisms include the enzymatic antioxidant defense system composed of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). However, in some cases, activation of the antioxidant system does not prevent the occurrence of oxidative damage, as observed by Baldissera et al. (2020a) in the plasma and muscle of matrinxã exposed to acute heat stress at higher temperatures. It is also important to mention that exposure to heat stress modulates muscle fatty acid profiles in fish, counteracting the effects of fluctuations in environmental temperature by restructuring membrane lipids through homeoviscous adaptation, ensuring the maintenance of membrane functions and permeability (Hazel, 1995). Baldissera et al. (2020a) found that the muscle fatty acid profiles of matrinxã exposed to 34 °C were modulated through increases in saturated fatty acids (SFA) and decreases in polyunsaturated fatty acids (PUFA), a condition that negatively affects the human population because SFA are related to increased cardiovascular risk (Mensink, 2016; Michielsen et al., 2019). Recent studies have demonstrated the positive effects of diets supplemented with plant-

based products in terms of heat stress-induced oxidative damage (Dawood et al., 2020; Xavier et al., 2020). These findings led us to hypothesize that nerolidol, a sesquiterpene with potent antioxidant capacity when added to fish diets (Baldissera et al., 2020b), would inhibit or reduce heat stress-induced oxidative damage and impairment of the muscle fatty acid profile.

Nerolidol (3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol) is a sesquiterpene alcohol commonly found in essential oils of aromatic plants and flowers such as neroli (*Citrus aurantium*), ginger (*Zingiber officinale*), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) (Azzi et al., 2018). A study conducted by Baldissera et al. (2020b) found that dietary supplementation with 1.0 mL nerolidol/kg diet exerted a potent antioxidant effect on the muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through a reduction of the total content of hydrogen peroxide and increased catalase activity, both of which contributed to a reduction of lipid damage, concluding that nerolidol exerts potent antioxidant activity via scavenging of free radicals. Moreover, the same authors found that this diet improved fillet quality through enhancement of fatty acid profiles via a decrease in the total content of SFA, as well as via augmentation of the total content of monounsaturated fatty acids (MUFA) and total content of PUFA, a condition that has positive effects for consumers. In summary, our hypothesis is that the potent antioxidant activity of nerolidol would prevent or reduce heat stress-induced oxidative damage and impairment of the fatty acid profile in matrinxã muscle. Therefore, the aim of this study was to determine whether dietary supplementation with nerolidol would prevent or reduce muscle oxidative damage and impairment of the fillet fatty acid profile of matrinxã exposed to heat str

2. Material and methods

2.1. Nerolidol

Nerolidol (molecular weight 223.37 g/mol, 97% purity) was purchased from Sigma-Aldrich® (catalogue number H59605).

2.2. Feed preparation

The main ingredients of the basal diet were corn (320 g/kg), poultry viscera meal (280.10 g/kg), soybean meal (74.40 g/kg), and feather meal (28 g/kg), which were crushed and mixed with other ingredients, providing all nutritional requirements for juvenile matrinxã (Table 1). The proximate nutrient composition and analyzed composition of the basal diet can be found in Table 1. To prepare the supplemented diet, nerolidol (1.0 mL/kg of feed) was pre-mixed with the soybean meal before mixing with other ingredients. The mixtures were dried in a forced-air circulation oven at 35 °C for 24 h, and the pellets were broken, sieved, and stored at 2 °C until use, following the method described by Baldissera et al. (2020b).

2.3. Matrinxã, maintenance, and water quality

Healthy matrinxã juveniles used in this experiment were bought from a commercial farm (Fazenda Santo Antônio: 02° 44' 802" S; 059° 28' 836" W, Amazonas, Brazil) and transported to the Laboratory of Ecophysiology and Molecular Evolution. Fish were maintained

for 15 days in 5000 L polyethylene aerated tanks with continuous water flow to recover from handling and transportation and to acclimate to laboratory conditions. During the acclimation period, matrinxã were fed basal diet once a day, at 2 p.m., in a proportion of 5% of total biomass to acclimate to the feed conditions used in the experiment. Any uneaten feed, feces, and other residues were removed daily 60 min post-feeding to maintain water quality. Finally, the water (approximately 75%) was changed every 2 days. Water quality variables were monitored every 2 days and remained stable throughout the acclimation period: temperature 28.1 ± 0.3 °C, pH 5.2 ± 0.3 , and dissolved oxygen 6.1 ± 0.2 mg/L.

2.4. Experimental set-up

A total of 72 juvenile matrinxã (mean weight: 25.05 ± 2.85 g; mean length: 11.11 ± 1.45 cm; mean \pm standard deviation) were used to determine plasma and muscle oxidative status parameters, as well as muscle fatty acid profile. Twelve polyethylene tanks were cleaned and rinsed with clean water and filled with 100 L of non-chlorinated water. At the start of the experiment, acclimated fish ($n = 72$) were randomly transferred into these 12 tanks and were divided into four groups ($n = 6$ per group) with three replicates each as follows: basal diet, control; nerolidol, control; basal diet, heat stress; and nerolidol, heat stress. The groups basal diet, control and basal diet, heat stress received the basal diet, while the groups nerolidol, control and nerolidol, heat stress received basal diet that contained 1.0 mL nerolidol/kg diet. All groups received their experimental diets once a day, at 2 p.m., for 14 consecutive days, in a proportion of 5% of total biomass, as recommended by Baldissera et al. (2020b) who observed the positive effects of diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed on the muscle antioxidant system and muscle fatty acid profile of Nile tilapia (*O. niloticus*). After 14 days of the experimental diet, the groups basal diet, heat stress and nerolidol, heat stress were subjected to

acute heat stress at 34 °C for 72 h, an exposure length and temperature that elicited impairment of plasma and muscle antioxidant capacity and disturbed the fillet fatty acid profiles of matrinxã (Baldissera et al., 2020a). To do this, the water temperature was regulated with a thermostat (Roxin Ht-1300, 200 W, Japan), gradually increasing from 28 °C (control) by 1 °C/hour to 34 °C, maintaining the fish inside the experimental tanks to avoid death from thermal shock, following the method described by Baldissera et al. (2020a). During the acute heat stress period, the matrinxã were fed with the same feed (basal diet) used before the acute heat stress period (fed once a day, at 2 p.m., at 5% of total biomass). General behavior (swimming, search for food, aggressiveness against conspecifics) was observed for 10 min during feeding time. The water quality parameters were evaluated daily (once a day) and remained within acceptable limits throughout the experimental period, as follows: pH = 5.2 ± 0.31 and dissolved oxygen = 6.0 ± 0.4 mg/L. The exact water temperature for each group was: 28 ± 0.12 °C and 28 ± 0.19 °C for groups basal diet, control and nerolidol, control, respectively, and 34.02 ± 0.11 °C and 34.01 ± 0.12 °C for groups basal diet, heat stress and nerolidol, heat stress, respectively. During the acute heat stress period, the water was no longer changed, to avoid alterations in water temperature. As an increase in water temperature usually causes a decrease in dissolved oxygen, the aeration was increased for groups exposed to heat stress to maintain similar dissolved oxygen levels for all groups. The Ethics Committee of INPA authorized all experimental procedures under number 004/2018, SEI 01280.000209/2018-74.

2.5. Growth performance and somatic indices

To evaluate the effects of the nerolidol-supplemented diet on matrinxã, the following morphological parameters were measured: body weight (BW), full length (FL), liver weight (LW), and visceral weight (VW). Moreover, growth performance and somatic indices were

calculated based on the method of Adeoye et al. (2020), as follows: weight gain (WG) = (final mean BW (g) – initial mean BW (g)); specific growth rate (SGR) = ((ln final BW – ln initial BW)/days of experiment × 100); feed conversion rate (FCR) = feed intake (g)/WG (g); feed intake (FI) = total feed consumed (g)/number of fish harvested; hepatosomatic index (HSI) = LW (g)/BW (g) × 100; viscerosomatic index (VSI) = VW (g)/BW (g) × 100; and survival = (total number of fish harvested/total number of fish stocked) × 100.

2.6. Sample collection

At the end of the experiment, two fish per tank ($n = 6$ per treatment) were anaesthetized with an excess of tricaine methanesulfonate (MS-222; 1.5 g/L) (Zanuzzo et al., 2018); and blood samples were promptly collected from the caudal vein using heparinized plastic syringes to avoid the consequences of stress and blood coagulation. An external evaluation of the body was performed to search for lesions on the skin (lack of scales) or damaged fins. Thereafter, matrinxã were euthanized by cerebral concussion following Ethics Committee recommendations. Subsequently, muscle tissue was removed and dissected on glass dishes over ice. Blood samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at 4 °C to obtain plasma, which was then stored at –80 °C until analysis. Muscle tissue was homogenized (1 : 10 w/v) in a glass Potter homogenizer with 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, and centrifuged at 2000 g for 10 min, and the supernatants were collected and stored at –80 °C until analysis of oxidative stress -related parameters.

2.7. Plasma and muscle oxidative stress-related parameters

2.7.1. Oxidant parameters

Plasma and muscle ROS levels were determined using 5 μ L of sample and using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation method described by LeBel et al. (1992) using excitation and emission wavelengths of 485 and 538 nm at 27 °C, respectively; results were expressed as U DCF/mg of protein. Plasma and muscle lipid peroxidation (LPO) levels were measured using 5 μ L of sample according to Monserrat et al. (2003), who used a technique based on the reaction of hydroperoxides with Fe^{2+} (FeSO_4) in an acid medium (H_2SO_4) in the presence of the dye xylenol orange at 550 nm and 27 °C; results were expressed as μ mol CHP/g of tissue.

2.7.2. Antioxidant parameters

Plasma and muscle SOD activity was evaluated spectrophotometrically (420 nm for 2 min at intervals of 10 s; 27 °C) as described by Marklund and Marklund (1974), which is based on the auto-oxidation of pyrogallol that is inhibited in the presence of SOD, using 5 μ L of sample. Enzymatic activity was expressed as U SOD/mg of protein. Plasma and muscle GPx activity was measured spectrophotometrically at 27 °C (340 nm) using tert-butyl hydroperoxide as substrate according to the methodology described by Paglia and Valentine (1967), a technique based on the disappearance of β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), using 5 μ L of sample. Enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/h/mg of protein.

2.8. Muscle fatty acid profile

To obtain the fatty acid profiles of the samples, the lipids were extracted employing a modification of the method of Bligh and Dyer (1959) according to Baldissera et al. (2020b), that promotes organic phase separation using methanol/water and chloroform. The chloroform

extracts were dried and the lipids were subjected to the methylation procedure described by Harman and Lago (1973), to obtain the fatty acid methyl esters (FAME). We injected 1 μ L of sample extracts into a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID) (Varian, Star, 3600, USA) and an autosampler (Varian, 8200, USA). All GC-FID conditions were adjusted as described by Baldissera et al. (2020b). The fatty acid profile results were expressed as the percentage of lipids, taking into account the correction factors of the FID and the conversion factor of ester to acid according to Visentainer (2012).

2.9. Determination of plasma and muscle protein

Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) using serum bovine albumin as the standard.

2.10. Statistical analysis

The data were subjected to tests of homogeneity of variance (Levene test) and the normality of residuals (Shapiro–Wilk test). Data that did not meet normality and homoscedasticity were transformed (log) and then analyzed using bilateral two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc analysis with significance set at $p < 0.05$. All results were expressed as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Growth performance

No significant difference was observed between groups with respect to WG, SGR, FCR, FI, HSI, VSI, or survival (data not shown). Fish from all groups showed normal swimming

behavior, all fish searched the food at the moment it was offered, and no aggressive behavior or signs of aggression (damaged fins, lesions on the body, lack of scales) were observed at the end of the experiment.

3.2. Plasma and muscle oxidative stress-related parameters

A significant interaction between consumption of nerolidol diet and exposure to heat stress was observed for plasma ROS (Fig. 1A) and LPO levels (Fig. 1B), as well as for plasma GPx activity (Fig. 1D). A significant effect of heat stress was observed for plasma SOD activity (Fig. 1C). Plasma ROS and LPO levels increased significantly in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to fish fed with basal diet and not exposed to heat stress. Consumption of nerolidol diet in fish not exposed to heat stress did not significantly affect plasma ROS and LPO levels compared to the group basal diet, control. Consumption of nerolidol diet in fish exposed to heat stress prevented the increase in plasma ROS and LPO levels compared to the group basal diet, heat stress (Fig. 1A and 1B). Plasma SOD and GPx activity decreased significantly in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to fish fed basal diet and not exposed to heat stress. Consumption of nerolidol diet in fish not exposed to heat stress did not significantly affect plasma SOD and GPx activity compared to the group basal diet, control. Dietary supplementation with nerolidol for the group exposed to heat stress did not prevent decreases in plasma SOD activity compared to the group basal diet, heat stress. On the other hand, plasma GPx activity was significantly higher in fish fed with nerolidol and exposed to heat stress compared to the group basal diet, heat stress, but remained significantly lower than that of the group basal diet, control (Fig. 1C and 1D).

A significant interaction between nerolidol supplementation and exposure to heat stress was observed for muscle ROS (Fig. 2A) and LPO levels (Fig. 2B), as well as for muscle GPx

activity (Fig. 2D). A significant effect of heat stress was observed for muscle SOD activity (Fig. 2C). Muscle ROS and LPO levels were significantly higher in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to the group basal diet, control. Dietary supplementation with nerolidol for the non-exposed group did not significantly affect muscle ROS and LPO levels compared to the group basal diet, control. Supplementation with nerolidol in fish exposed to heat stress prevented the increase in muscle ROS and LPO levels compared to the group basal diet, heat stress (Fig. 2A and 2B). Muscle SOD and GPx activity was significantly lower in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to fish fed basal diet and not exposed to heat stress. Diets containing nerolidol in fish not exposed to heat stress did not significantly affect muscle SOD and GPx activity compared to the group basal diet, control. Dietary supplementation with nerolidol for the group exposed to heat stress did not prevent the decrease in muscle SOD activity compared to the group basal diet, heat stress, but prevented the decreases in muscle GPx activity (Fig. 2C and 2D).

3.3. Muscle fatty acid profile

A significant interaction between consumption of nerolidol diet and exposure to heat stress was observed for total muscle SFA, PUFA, and n3 levels (Table 2). Levels of muscle SFA were significantly higher in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to fish fed basal diet and not exposed to heat stress, while muscle levels of PUFA and n3 were significantly lower. Dietary supplementation with nerolidol for the non-exposed group did not significantly affect muscle levels of SFA, PUFA, and n3 compared to the group basal diet, control. Supplementation with nerolidol in fish exposed to heat stress prevented the increase in muscle SFA levels compared to the group basal diet, heat stress, and prevented the decrease in muscle PUFA levels compared to the group basal diet, heat stress. Total muscle n3 levels were

significantly higher in fish fed with nerolidol and exposed to heat stress compared to the group basal diet, heat stress, but remained significantly lower than in the group basal diet, control. No significant differences were observed between groups regarding total MUFA, n6, or n9 levels (Table 2).

Significant interactions between nerolidol consumption and exposure to heat stress were observed for muscle levels of C10:0 (capric acid), C14:0 (myristic acid), C15:0 (pentadecanoic acid), C18:3n3 (alpha-linolenic acid), C18:3n6 (gamma-linolenic acid), C20:5n3 (eicosapentaenoic acid), and C22:6n3 (docosahexaenoic acid) (Table 3). Muscle levels of C10:0, C14:0, and C15:0 were significantly higher in fish fed basal diet and exposed to heat stress compared to fish fed basal diet and not exposed to heat stress, while muscle levels of C18:3n3, C18:3n6, C20:5n3, and C22:6n3 were significantly lower in the group basal diet, heat stress compared to the group basal diet, control. Dietary supplementation with nerolidol for the non-exposed group did not significantly affect muscle levels of C10:0, C14:0, C15:0, C18:3n3, C18:3n6, C20:5n3, or C22:6n3 compared to the group basal diet, control. Supplementation with nerolidol in fish exposed to heat stress prevented the increase in muscle levels of C14:0 and C15:0 compared to the group basal diet, heat stress, while preventing the decrease in muscle levels of C18:3n3, C18:3n6, C20:5n3, and C22:6n3 in the group nerolidol, heat stress compared to the group basal diet, heat stress. However, muscle levels of C10:0 were significantly lower in fish fed nerolidol and exposed to heat stress compared to the group basal diet, heat stress, but remained significantly higher than in the group basal diet, control. No significant differences were observed between groups regarding muscle levels of C16:0 (palmitic acid), C17:0 (heptadecanoic acid), C18:0 (stearic acid), C20:0 (arachidic acid), C14:1 (myristoleic acid), C16:1 (palmitoleic acid), C18:1t (oleic acid trans isomer), C18:1n7c (vaccenic acid), C18:1n9c (oleic acid), C18:1n9t (elaidic acid), C20:1n9 (cis-11-eicosenoic acid), C22:1n9 (erucic acid),

C24:1n9 (nervonic acid), C18:2n6 (linoleic acid), C20:2n6 (cis-11,14-eicosadienoic acid), C20:3n6 (cis-8,11,14-eicosatrienoic acid), or C22:5n3 (docosapentaenoic acid) (Table 3).

4. Discussion

The results of the present study clearly indicate the impairment of plasma and muscle oxidant/antioxidant status through increased ROS production and lipid damage, as well as via inhibition of the antioxidant enzymatic system by downregulation of SOD and GPx activity in *matrinxã* exposed to acute heat stress. Moreover, this study revealed that the homeoviscous adaptation process to cope with heat stress damages the fillet fatty acid profile by augmenting the total content of SFA and decreasing the total content of PUFA, a condition that may negatively impact fish consumers. The most important data from the present study are that dietary supplementation with 1.0 mL nerolidol/kg feed prevents (in plasma) and reduces (in muscle) ROS overproduction, and also prevents lipid damage and improves GPx activity. Finally, this diet prevents impairment of the total content of SFA and PUFA in the fillet of *matrinxã* exposed to heat stress, which can positively affect fish consumers.

Exposure to acute heat stress at 34 °C for 72 h elicited a significant increase in muscle and plasma ROS and LPO levels, suggesting the overproduction of free radicals and damage to membrane lipids, in agreement with the findings of Baldissera et al. (2020a) in the plasma and muscle of *matrinxã*. According to these authors, elevation of plasma and muscle ROS levels was a consequence of increased demand for oxygen consumption that accelerates mitochondrial respiration uncoupled to adenosine triphosphate generation and, consequently, generates excessive oxygen free radicals within tissues, caused by warming and high carbon dioxide levels. Similarly, Campos et al. (2019) described a direct relationship between the elevation of

oxygen demand and a concomitant increase in muscle ROS levels in two Amazon fishes (*Hyphessobrycon melazonatus* and *Apistogramma agassizi*) subjected for 30 days to extreme climate scenarios (water temperature 30.5 °C) compared with normal ambient climate (water temperature 26.5 °C), concluding that oxidative stress during exposure to heat stress is linked to elevation of oxygen requirements. Moreover, a study by Joy et al. (2017) reported that heat stress (38 °C) causes lipid damage in the muscle of green chromide (*Etroplus suratensis*) after 24, 48, and 72 h of exposure compared to the control group (27 °C), concluding that high temperature causes significant oxidative damage to fish muscle. It is important to highlight that lipids are responsible for maintaining the integrity of cellular membranes, and excessive peroxidation for a long period of time alters membrane assembly, composition, structure, dynamics of lipid membranes, ion gradients, lipid–lipid interactions, membrane fluidity, and membrane permeability (Gaschler and Stockwell, 2017), all of which affect the physiology of matrix. In order to cope with oxidative stress, the antioxidant defense system can be upregulated to reduce excessive production of free radicals, and consequently tissue oxidative damage. However, when the antioxidants are no longer capable of coping with ROS or other free radicals, as observed in this study with inhibition of plasma and muscle SOD and GPx activity, free radicals react with the lipid components of cellular or subcellular membranes, resulting in the loss of cellular integrity, as recently observed by Baldissera et al. (2020a) in the plasma and muscle of matrix exposed to heat stress at 34 °C for 72 h. Deterioration of SOD activity can impair the capacity of the enzyme to catalyze the dismutation of superoxide ion into oxygen and hydrogen peroxide (H₂O₂), while reduction of GPx activity impairs the decomposition of H₂O₂ into water and oxygen, a condition that disfavors the maintenance of a positive balance between antioxidants and oxidants (Xavier et al., 2020). In summary, acute exposure to thermal stress leads to the exhaustion of antioxidants and thereby to a decline in

the defense offered by them, inducing the loss of cellular integrity, a condition that results in oxidative damage.

Dietary supplementation with 1.0 mL nerolidol/kg diet over 14 days reduced heat stress-induced muscle ROS levels and also prevented the increase of plasma ROS levels and muscle and plasma LPO levels, suggesting less formation of free radicals and the absence of lipid damage. Moreover, we observed that this diet improved plasma and muscle GPx activity, suggesting a better capacity to remove H₂O₂ by forming water and oxygen, i.e., presenting a potent antioxidant capacity that may contribute to the absence of lipid damage. Similar to our observations, Baldissera et al. (2020b) reported a significant reduction of muscle LPO levels in Nile tilapia fed 1.0 mL nerolidol/kg diet under physiological conditions for 60 days, revealing its potent capacity to scavenge free radicals. Moreover, the same authors found that this diet improved muscle catalase activity, suggesting a better capacity to remove H₂O₂, which is considered a potent oxidant molecule. The effects of nerolidol on the antioxidant/oxidant status in fish remain poorly studied; nevertheless, its potent antioxidant capacity in mammals has been extensively studied. Iqbal et al. (2019) reported that nerolidol (200 and 400 mg/kg BW; intraperitoneally) ameliorated cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain via reduction of lipid damage and increased catalase activity, demonstrating that nerolidol reduces the neurotoxic effects of cyclophosphamide. Similarly, Asaikumar et al. (2019) demonstrated that 200 mg nerolidol/kg BW over 23 days reduces isoproterenol-induced cardiac oxidative damage in rats, improving catalase and SOD activity that is responsible for these protective effects against lipid damage, revealing the potent antioxidant capacity of nerolidol. Finally, Chan et al. (2016) suggested that nerolidol mediates potent antioxidant activity by scavenging free radicals, preventing LPO and enhancing the production of antioxidant enzymes in cells for protection against oxidative stress, as evidenced in our current study. In summary, a diet

supplemented with 1.0 mL nerolidol/kg feed can be considered a suitable strategy to reduce or prevent heat stress-induced plasma and muscle oxidative damage.

Phospholipids of cell membranes in fishes can be restructured to maintain cellular integrity and consequently maintenance of membrane function during temperature oscillations, a process known as homeoviscous adaptation (Hazel et al., 1995; Fadhlou and Couture, 2016). In the present study, the muscle fatty acid profile of matrinxã exposed to heat stress (34 °C) over 72 h was remodeled in an attempt to maintain the integrity of muscular membrane and its functions, which occurred through significant increases of the total content of SFA and decreases in the total content of PUFA and total n3 fatty acids, in agreement with the findings by Baldissera et al. (2020a) in the muscle of matrinxã exposed for 72 h to 34 °C. According to these authors, matrinxã counteracts the effects of fluctuations in water temperature on the properties and function of its membranes by restructuring membrane lipids, manifesting as an increased total content of SFA and decreased total content of PUFA. It is important to emphasize that restructuring of fish membranes during heat stress involves a series of enzymatic cascades, including three types of desaturases (acyl-CoA, acyl-lipid, and acyl-ACP) and elongases (mainly elongation of very long chain fatty acids protein \neq ELOVL2), which are considered key enzymes involved in fatty acid synthesis and remodeling pathways (Trueman et al., 2000; Tocher et al., 2004; Fadhlou and Couture, 2016). The remodeling of muscle fatty acid composition observed in our present study can negatively impact human nutrition, because it occurs through an increase in SFA, a class of fatty acids that is unhealthy for the cardiovascular system due to its effects on cholesterol metabolism, and higher levels of low-density lipoproteins, both risk factors for coronary heart disease (Mensink et al., 2016). The decrease in the total content of PUFA can be also considered a negative effect for fish consumers because their consumption has been related to a reduction in cardiovascular diseases because they decrease inflammation and reduce triglyceride and total cholesterol levels

(Michielsen et al., 2019). Regarding specific fatty acids, only 7 from a total of 24 were significantly altered in the muscle of matrinxã subjected to heat stress, and it is extremely important to emphasize the significant reduction of EPA and DHA fatty acids, because they are linked to several benefits for human health (Calder, 2018). A meta-analysis by Kotwal et al. (2015) revealed that the consumption of EPA and DHA protects against cardiovascular death. A meta-analysis of 31 clinical trials concluded that consumption of marine-derived EPA and DHA for a period of 6 months reduces any cardiovascular event by 10% and lowers the risk of cardiac death and fatal or non-fatal coronary events by 9% and 18%, respectively, suggesting the importance of these fatty acids for human nutrition (Delgado-Lista et al., 2012). Thus, the alteration in muscle fatty acid profiles of matrinxã to cope with heat stress can negatively affect human health via consumption of fillets with a poor fatty acid quality.

The use of a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg diet for 14 days prevented an increase of the total content of SFA and decreases in the total content of PUFA, as well as alterations in specific fatty acids that can be considered positive effects for fish health and fish consumers. Similar to our observations, Baldissera et al. (2020b) demonstrated that use of this diet for 60 days improved the fillet fatty acid profiles of Nile tilapia via increased PUFA content and decreased SFA content, a positive condition for fish consumers. The exact mechanism of action linked to the effects of nerolidol on fatty acid composition remains unknown and does not appear to be directly related to effects on elongase or desaturase enzymes; however, it does appear to be associated with an improvement in antioxidant status, i.e., an indirect effect. The oxidative damage elicited by excessive ROS overproduction alters the composition of membrane lipids, which can cause a decrease in total PUFA levels. Thus, a diet capable of preventing ROS overproduction, as observed in our present study, avoids the alteration of PUFA content. In agreement with our observations, Baldissera et al. (2020b) found an improvement of antioxidant/oxidant status that occurred by the reduction of muscle ROS

formation and lipid damage, as well as via increased enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems, all of which improve the fatty acid profiles in the fillet of Nile tilapia. Thus, this diet can be considered a suitable strategy to improve the fatty acid profile in fish muscle during heat stress.

Based on these data, we conclude that acute heat stress at 34 °C for 72 h causes plasma and muscular oxidative damage, and that homeoviscous adaptation to maintain membrane fluidity can represent a negative impact for fish consumers. Moreover, dietary supplementation with nerolidol can be considered a suitable strategy to prevent heat stress-induced oxidative damage and impairment of fish muscle fatty acid profiles, confirming our initial hypothesis.

Acknowledgements

The authors are grateful to the INCT-ADAPTA (CNPq (465540/2014-7)/FAPEAM (062.1187/2017)) and Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (finance code 001). ALV is the recipient of a research fellowship from CNPq.

REFERENCES

Adeoye AA, Obasa SO, Fawole FJ, Wan AHL, Davies SJ. Dietary supplementation of autolysed yeast enhances growth, liver functionality and intestinal morphology in African catfish. *Aquaculture Nutrition* 26, 772-780, 2020.

Asaikumar L, Vennila L, Akila P, Sivasangari S, Kanimozhi K, Premalatha V, Sindhu G. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. *Drug. Dev. Res.* 80, 814-823, 2019.

Azzi J, Auezova L, Danjou PE, Fourmentin S, Greige-Gerges H. First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol. *Food Chemistry* 255, 399-404, 2018.

Baldissera MD, Souza CF, Barroso DC, Falk RB, Wagner R, Baldisserotto B, Val AL. Disturbance of oxidant/antioxidant status and impairment on fillet fatty acid profiles in *Brycon amazonicus* subjected to acute heat stress. *Fish Physiol. Biochem* 46, 1857-1866, 2020a.

Baldissera MD, Souza CF, Zeppenfeld CC, Velho MC, Klein B, Abbad LB, Ourique AF, Wagner R, Da Silva AS, Baldisserotto B. Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. *Aquaculture* 516, 734635, 2020b.

Banaduc D, Joy M, Ososutean H, Afanasyev S, Curtean-Banaduc A. Natural and anthropogenic driving forces as key elements in the Lower Danube Basin South-Eastern Carpathians-North-Western Black Sea coast area lakes: a broken stepping stones for fish in a climatic change scenario? *Environmental Sciences Europe* 32, e73, 2020.

Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification Canadian. *JCP Biochem. Phys.* 37, 911–917

Campos, D.F., Braz-Mota, S., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2019. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. *Ecol. Indicat.* 101, 533–540.

Cardoso PG, Resende-de-Oliveira R, Rocha E. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. *Environmental Pollution* 252, 1059-1067, 2019.

Dawood MAO, Eweedah NM, El-Shawary ME, Awad SS, Van Doan H, Paray BA. Dietary white button mushroom improved the growth, immunity, antioxidative status and resistance against heat stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 523, 735229, 2020.

Delgado-Lista, J.; Perez-Martinez, P.; Lopez-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A systematic review. *Br. J. Nutr.* 2012, 107, S201-S213.

Fadhlaoui M, Couture P. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 180, 45-55, 2016.

Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 419-425, 2017.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 502, 183-186, 2018.

Hartman L, Lago RCA (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice* 22, 475-476.

Hicks, C.C., Cohen, P.J., Graham, N.A.J., Nash, K.L., Allison, E.H., D'Lima, C., Mills, D.J., Roscher, M., Thilsted, S.H., Thorne-Lyman, A.L., MacNeil, M.A., 2019. Harnessing global fisheries to tackle micronutrient deficiencies. *Nature* 574 (7776), 95-98.

IPCC, 2014. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. In: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B. (Eds.), Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental

Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p. 1132.

Iqbal A, Sharma S, Najmi AK, Syed MA, Ali J, Alam M, Haque SE. Nerolidol ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, neuroinflammation and cognitive dysfunction: Plausible role of Nrf2 and NF- κ B. *Life Sciences* 236, 116867, 2019.

Jiao, T., Williams, C.A., Ghimire, B. et al. Global climate forcing from albedo change caused by large-scale deforestation and reforestation: quantification and attribution of geographic variation. *Climatic Change* 142, 463-476 (2017).

Joy S, Alikunju AP, Jose J, Sudha HSH, Parambath PM, Puthiyedathu ST, Philip B. Oxidative stress and antioxidant defense responses of *Etroplus suratensis* to acute temperature fluctuations. *Journal of Thermal Biology* 70, 20-26, 2017.

Jung EH, Brix KV, Richards JG, Val AL, Brauner CJ. Reduced hypoxia tolerance and survival at elevated temperatures may limit the ability of Amazonian fishes to survive in a warming world. *Science of The Total Environment* 748, 141349, 2020.

Kotwal, S.; Jun, M.; Sullivan, D.; Perkovic, V.; Neal, B. Omega 3 Fatty acids and cardiovascular outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 2012, 5, 808-818.

Krabbenhof TJ, Myers BJE, Wong JP, Chu C, Tingley RW, Falke JA, Kwak TJ, Paukert CP, Lynch AJ. FiCli, the Fish and Climate Change Database, informs climate adaptation and management for freshwater fishes. *Scientific Data* 7, e124, 2020.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 227-231.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–267.

Macedo, M.N., Coe, M.T., DeFries, R., Uriarte, M., Brando, P.M., Neill, C., Walker, W.S., 2013. Land-use-driven stream warming in southeastern Amazonia. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368, 20120153.

Marengo, J.A., 2009. Future change of climate in South America in the late 21st century: the CREAS project. *Atmos. Sci. Sect. AGU Newsl.* 3, 5.

Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.

Mensink, R., 2016. Effects of Saturated Fatty Acids on Serum Lipids and Lipoproteins: A Systematic Review and Regression Analysis. World Health Organization, Geneva.

Michielsen, C.C.J.R., Hangelbroek, R.W.J., Feskens, E.J.M., Afman, L.A., 2019. Disentangling the effects of monounsaturated fatty acids from other components of a mediterranean diet on serum metabolite profiles: a randomized fully controlled dietary intervention in healthy subjects at risk of the metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, e1801095.

Michielsen, C.C.J.R., Hangelbroek, R.W.J., Feskens, E.J.M., Afman, L.A., 2019. Disentangling the effects of monounsaturated fatty acids from other components of a mediterranean diet on serum metabolite profiles: a randomized fully controlled dietary intervention in healthy subjects at risk of the metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, e1801095.

Monserrat JM, Geracitano LA, Pinho GLL, Vinagre TM, Faleiros M, Alciati JC, Bianchini A (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 177-183.

Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.

Tocher, DR, Fonseca-Madrigal, J, Dick, JR, Ng, WK, Bell, JG, Campbell, PJ (2004). Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys. B* 137, 49–63.

Trueman, RJ, Tiku, PE, Caddick, MX, Cossins, AR (2000). Thermal thresholds of lipid restructuring and delta (9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 641-650.

Viña J, Borras C, Gomez-Cabrera MC. A free radical theory of frailty. *Free Radical Biology and Medicine* 124, 358-363, 2018.

Visentainer JV (2012). Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* 35, 274-279.

Xavier WDS, Leclercq E, Carvalho PLPF, Vicente IST, Guimarães MG, Rodrigues EJD, Milanezi RC, Barbé F, Sartori MMP, Pezzato LE, Barros MM. The putative effect of a SOD-rich melon pulp-concentrate on growth performance and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquaculture* 529, 735669, 2020.

Zanuzzo FS, Oda MD, Hoshiba MA, Senhorini JA, Zaiden SF, Urbinati EC. A description of liver and blood changes in matrinxã (*Brycon amazonicus*) during induced spawning. *Aquaculture* 495, 345-350, 2018.

Table 1. Centesimal and calculated compositions of fish diet.

Ingredient	g/kg
Ground corn	320.00
Poultry viscera meal	280.10
Soybean meal	74.40
Limestone	40.00
Feather meal	28.00
Vitamin and mineral premix ¹	4.00
Propionic acid (antifungal)	1.00
Butyl-hydroxy-toluene (BHT)	0.50
Calculated composition	
Dry matter, %	90.650
Digestible energy, kcal/kg	3.250
Calcium, %	2.485
Available phosphorus, %	0.988
Sodium, %	0.196
Neutral detergent fiber, %	1.291
Acid detergent fiber, %	1.140

¹Each 1 kg of premix contains a minimum of: copper, 357 mg; chromium, 9.4 mg; iron, 2.34 g; manganese, 1.17 g; selenium, 10.5 mg; sodium, 40.8 g; zinc, 2.81 g; folic acid, 93.7 mg; pantothenic acid, 468 mg; biotin, 10.55 mg; choline, 12.5 g; niacin, 703 mg; vitamin A, 233000 UI; vitamin B12, 703 µg; vitamin B2, 117 mg; vitamin B6, 70 mg; vitamin D3, 46600 UI, vitamin E, 1288 UI; vitamin K3, 58 mg.

Table 2. Total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA), omega 3 (n3), omega 6 (n6), and omega 9 (n9) in the fillet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress.

Fatty acid/group	Basal diet, control	Nerolidol, control	Basal diet, heat stress	Nerolidol, heat stress	<i>F</i> and <i>p</i> values
∑ SFA	40.84 ± 1.28 ^b	42.24 ± 1.69 ^b	47.88 ± 1.31 ^a	42.85 ± 1.44 ^b	3.44; 0.041
∑ MUFA	38.65 ± 2.99 ^a	38.34 ± 3.56 ^a	36.35 ± 2.44 ^a	36.85 ± 5.56 ^a	1.09; 0.456
∑ PUFA	20.51 ± 0.71 ^a	19.42 ± 0.34 ^a	15.77 ± 0.71 ^b	20.30 ± 0.12 ^a	4.11; 0.022
∑ n3	7.44 ± 0.18 ^a	6.86 ± 0.15 ^a	5.69 ± 0.25 ^c	6.13 ± 0.07 ^b	2.62; 0.045
∑ n6	12.10 ± 3701 ^a	13.30 ± 1.38 ^a	12.77 ± 1.16 ^a	14.34 ± 4.28 ^a	1.99; 0.199
∑ n9	32.46 ± 2.58 ^a	33.18 ± 3.20 ^a	31.39 ± 3.65 ^a	34.05 ± 5.49 ^a	1.22; 0.511

Note 1: Values accompanied by different letters in the same line are statistically different, considering $p < 0.05$. **Note 2:** *F* and *p* values highlighted in bold indicate significant difference between groups using a two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; $n = 6$ per group).

Table 3. Fillet fatty acid profile (g/kg) of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress.

Fatty acid/group	Basal diet, control	Nerolidol, control	Basal diet, heat stress	Nerolidol, heat stress	<i>F</i> and <i>p</i> values
C10:0	0.27 ± 0.084 ^c	0.34 ± 0.034 ^c	0.60 ± 0.004 ^a	0.41 ± 0.03 ^b	9.80; 0.0001
C14:0	0.70 ± 0.11 ^b	0.80 ± 0.22 ^b	1.26 ± 0.30 ^a	0.87 ± 0.13 ^b	6.55; 0.0003
C15:0	0.21 ± 0.06 ^b	0.21 ± 0.04 ^b	0.26 ± 0.06 ^a	0.21 ± 0.06 ^b	7.11; 0.0002
C16:0	25.10 ± 1.32 ^a	27.05 ± 1.73 ^a	27.67 ± 1.37 ^a	27.56 ± 1.28 ^a	1.29; 0.212
C17:0	0.43 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.05 ^a	0.47 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.05 ^a	1.02; 0.411
C18:0	13.51 ± 1.13 ^a	13.19 ± 0.67 ^a	13.75 ± 1.22 ^a	13.34 ± 2.30 ^a	0.97; 0.654
C20:0	0.18 ± 0.05 ^a	0.15 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.08 ^a	0.87; 0.567
C14:1	0.10 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.92; 0.589
C16:1	1.78 ± 0.54 ^a	1.94 ± 0.27 ^a	1.69 ± 0.35 ^a	1.83 ± 0.35 ^a	0.71; 0.654
C18:1t	0.79 ± 0.15 ^a	0.88 ± 0.08 ^a	0.85 ± 0.16 ^a	0.85 ± 0.14 ^a	1.20; 0.145
C18:1n7c	2.05 ± 0.11 ^a	2.07 ± 0.11 ^a	2.08 ± 0.13 ^a	2.14 ± 0.27 ^a	1.221; 0.231
C18:1n9c	28.10 ± 1.45 ^a	29.50 ± 2.35 ^a	27.15 ± 2.50 ^a	29.24 ± 3.92 ^a	0.71; 0.572
C18:1n9t	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.04 ^a	0.43; 0.998
C20:1n9	0.52 ± 0.07 ^a	0.58 ± 0.07 ^a	0.55 ± 0.06 ^a	0.56 ± 0.09 ^a	0.57; 0.822
C22:1n9	3.40 ± 0.91 ^a	3.11 ± 0.65 ^a	3.19 ± 0.93 ^a	3.30 ± 0.62 ^a	1.41; 0.112
C24:1n9	0.30 ± 0.06 ^a	0.26 ± 0.06 ^a	0.31 ± 0.05 ^a	0.37 ± 0.09 ^a	1.11; 0.120
C18:2n6	9.96 ± 3.24 ^a	11.54 ± 1.12 ^a	10.78 ± 0.63 ^a	12.52 ± 3.89 ^a	1.00; 0.127
C18:3n3	0.45 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.07 ^a	0.33 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.02 ^a	3.11; 0.002
C18:3n6	0.15 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^a	3.45; 0.001
C20:2n6	0.49 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.09 ^a	0.50 ± 0.09 ^a	0.51; 0.311

C20:3n6	1.54 ± 0.33 ^a	1.33 ± 0.26 ^a	1.65 ± 0.21 ^a	1.49 ± 0.18 ^a	1.34; 0.101
C20:5n3	1.57 ± 0.28 ^a	1.40 ± 0.15 ^a	0.97 ± 0.11 ^b	1.39 ± 0.10 ^a	2.89; 0.001
C22:5n3	0.60 ± 0.15 ^a	0.54 ± 0.12 ^a	0.57 ± 0.17 ^a	0.52 ± 0.15 ^a	0.35; 0.754
C22:6n3	4.98 ± 1.01 ^a	5.07 ± 1.08 ^a	3.55 ± 0.20 ^b	4.85 ± 0.07 ^a	4.32; 0.0001

Note 1: Capric acid (C10:0), myristic acid (C14:0), pentadecanoic acid (C15:0), palmitic acid (C16:0), heptadecanoic acid (C17:0), stearic acid (C18:0), arachidic acid (C20:0), myristoleic acid (C14:1), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid trans isomer (C18:1t), vaccenic acid (C18:1n7c), cis-9-octadecenoic acid (oleic acid) (C18:1n9c), trans-9-octadecenoic acid (elaidic acid) (C18:1n9t), cis-11-eicosenoic acid (C20:1n9), erucic acid (C22:1n9), nervonic acid (C24:1n9), linoleic acid (C18:2n6), alpha-linolenic acid (C18:3n3), gamma-linolenic acid (C18:3n6), cis-11,14-eicosadienoic acid (C20:2n6), cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (C20:3n6), eicosapentaenoic acid (C20:5n3), docosapentaenoic acid (C22:5n3), and docosahexaenoic acid (C22:6n3). **Note 2:** Values accompanied by different letters in the same line are statistically different, considering $p < 0.05$. **Note 3:** F and p values highlighted in bold indicate significant difference between groups using a two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; $n = 6$ per group).

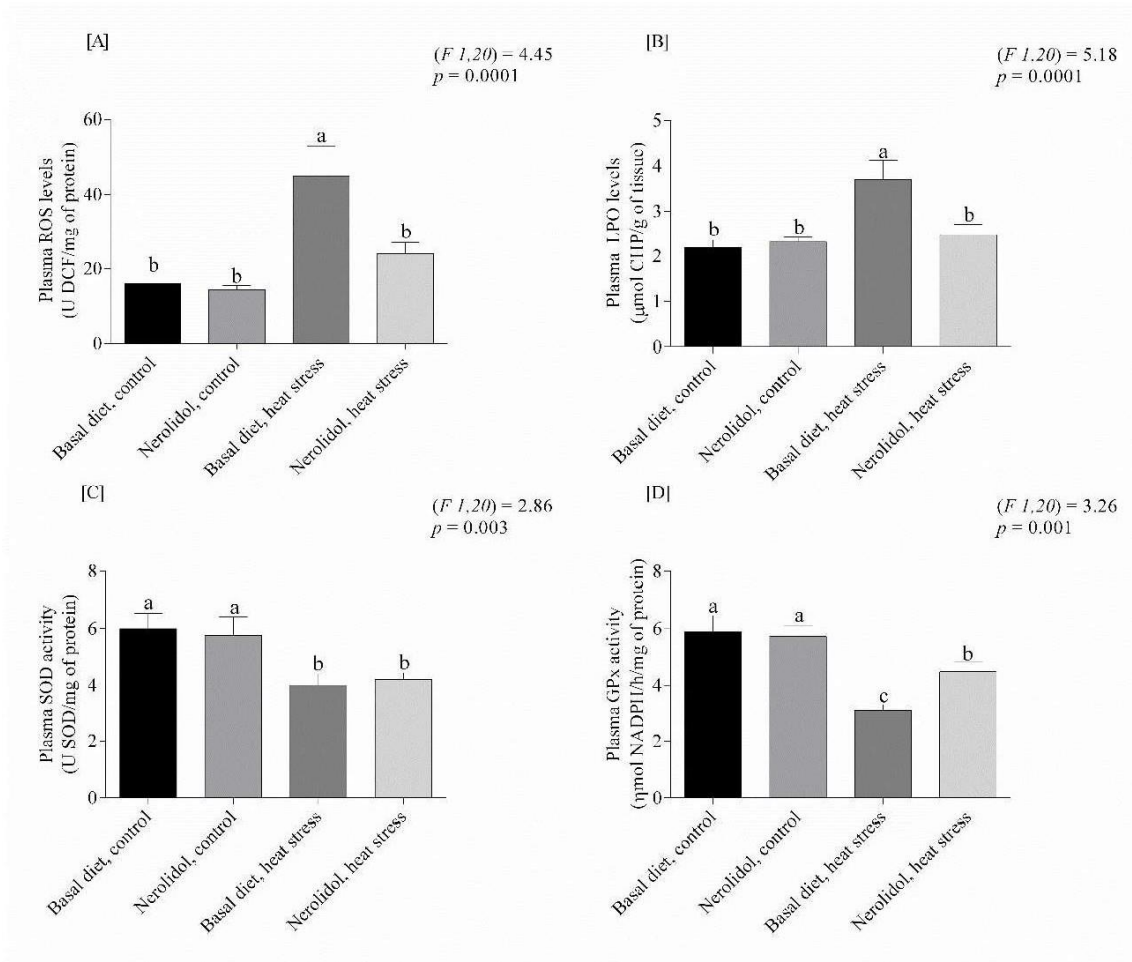


Fig. 1. Plasma reactive oxygen species (ROS) [A] and lipid peroxidation (LPO) [B] levels, and superoxide dismutase (SOD) [C] and glutathione peroxidase (GPx) [D] activity of matrinxã (*Brycon amazonicus*) juveniles fed a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress. Bars that do not share a common superscript letter differ significantly using two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; $n = 6$ per group).

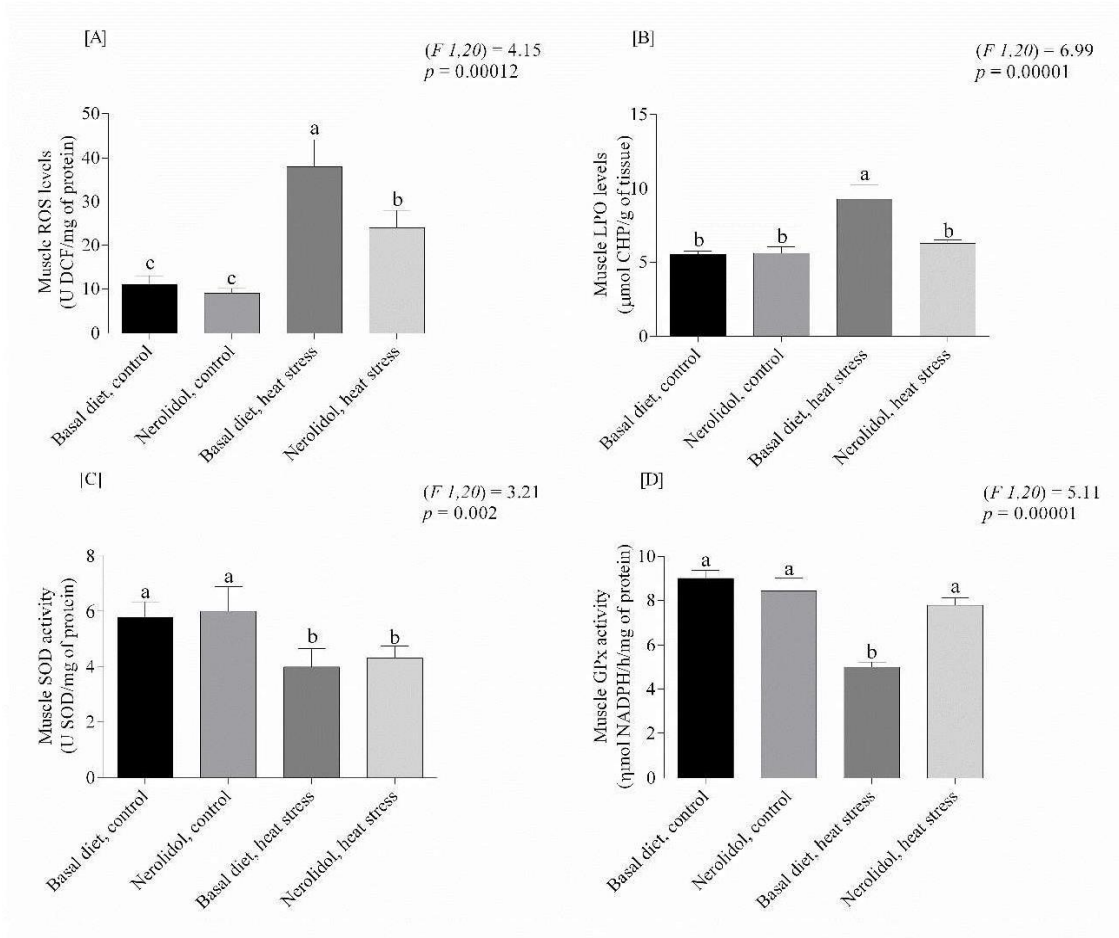


Fig. 2. Muscle reactive oxygen species (ROS) [A] and lipid peroxidation (LPO) [B] levels, and superoxide dismutase (SOD) [C] and glutathione peroxidase (GPx) [D] activity of *Brycon amazonicus* juveniles fed with a diet containing 1.0 mL nerolidol/kg feed for 14 days and exposed for 72 h to acute heat stress. Bars that do not share a common superscript letter differ significantly using two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$; $n = 6$ per group).

5. REFERENCIAS

- ALÉXIS. S, *et al.* effect of density stocking on the growth of matrinxã *B. amazonicus* in small cages. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. c, n. 1, p. 81–92, 2010.
- ALY.N, EL-GENDY. K, MAHMOUD. F, EL-SEBAE. A. K. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 7 12, 2010.
- ALFONSO.S, GESTO. M e SADOUL. B. Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. **Journal of Fisch B.** v 98, p 1496-1508, 2021.
- ANACLETO, P. *et al.* Effect of warming on protein, glycogen and fatty acid content of native and invasive clams. **Food Research International**, v. 64, p. 439-445, 2014.
- ASAIKUMAR, L. *et al.* Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. **Drug Development Research**, v. 80, n. 6, p. 814–823, 2019.
- AZZI, J. *et al.* First evaluation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as an encapsulating system for nerolidol. **Food Chemistry**, v. 255, p. 399-404, 2018.
- BALDISSERA, M. D. *et al.* Disturbance of oxidant/antioxidant status and impairment on fillet fatty acid profiles in *B. amazonicus* subjected to acute heat stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1857–1866, 2020a.
- BALDISSERA, M. D. *et al.* Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. **Aquaculture**, v. 516, n. September 2019, p. 734635, 2020b.
- BĂNĂDUC, D. *et al.* Natural and anthropogenic driving forces as key elements in the Lower Danube Basin South-Eastern Carpathians North-Western Black Sea coast area lakes: a broken stepping stones for fish in a climatic change scenario? **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 1, 2020.
- BANDEIRA JUNIOR, G. *et al.* Combined effect of florfenicol with linalool via bath in combating *Aeromonas hydrophila* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture**, v. 545, n. July, p. 737247, 2021.
- BARATA, M. *et al.* Efficiency of 2-phenoxyethanol and Clove Oil for Reducing Handling Stress in Reared Meagre, *Argyrosomus regius* (Pisces: *Sciaenidae*). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, n. 1, p. 82–92, 2016.

BARBAROSSA, V. et al. Threats of global warming to the world's freshwater fishes. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021.

BASTAKI, S. M. A. et al. Nerolidol, a sesquiterpene, attenuates oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 9, p. 3497–3512, 2021.

BUTCHART, S. H. M. et al. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. **Science**, v. 328, p. 1164–1168, 2010.

CALDER, P. C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 77, n. 1, p. 52–72, 2018.

CAMPOS, D. F. et al. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, v. 101, n. September 2018, p. 533–540, 2019.

CARDOSO, P. G.; RESENDE-DE-OLIVEIRA, R.; ROCHA, E. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1059–1067, 2019.

CARSON, C. F and HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils In: Thormar H (ed.). *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. **Chichester: Wiley**, p. 203–238, 2011.

CHAN, W. K. et al. **Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities**. [s.l: s.n.]. v. 21

CRUZ, C. I. A et al. A sodium alginate bilayer coating incorporated with green propolis extract as a powerful tool to extend *Colossoma macropomum* fillet shelf-life. **Food Chem.**v.355, p 129-610, 2021.

DAWOOD, M.A. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. **Aquaculture**. v 13, p 642-663, 2022.

DE BARROS, I. B. A, VILLACORTA-CORREA, M. A, CARVALHO, T. B. Stocking density and water temperature as modulators of aggressiveness, survival and zootechnical performance in matrinxã larvae, *B. amazonicus*. **Aquaculture**, v. 502, n. October 2018, p. 378–383, 2019.

DE FREITAS SOUZA, C. et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

- DINARDO, F. R *et al.* A multi-biomarker approach in european sea bass exposed to dynamic temperature changes under dietary supplementation with *O. vulgare* essential oil. **Animals**. v 11, p 982, 2021.
- DJURICIC, I and CALDER, P. C. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. **Nutrients**, v. 13, n. 7, 2021.
- DOS SANTOS FILHO, L. C and DA BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *B. amazonicus* (characidae) na Amazônia central. **Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 195–203, 2009.
- DUDGEON, D. *et al.* Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308–323, abr. 2007.
- FAWZYI *et al.* The effects of dietary oregano essential oil on the growth performance, intestinal health, immune, and antioxidative responses of Nile tilapia under acute heat stress. **Aquaculture**, v. 541, 2022.
- FIGUEIREDO, P. S. *et al.* Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–32, 2017.
- FERREIRA M.F *et al.* Use of energetic substrates after feeding in two Amazon Characidae fish: *Colossoma macropomum* and *Brycon amazonicus* . **Aquaculture Research**.v 55, p 4550-4562,2021.
- FRANÇA, B. K. *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.
- FRANMIR *et al.* Essential oils of *L. sidoides* and *M. piperita* as reducers of stress during the transport of *C. macropomum*. **Aquaculture**, v. 560, 2022.
- FROYEN, E and BURNS-WHITMORE, B. The effects of linoleic acid consumption on lipid riskmarkers for cardiovascular disease in healthy individuals: A review of human intervention trials. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 1–19, 2020.
- GANACHAUD, A.S. *et al.* Observed and expected changes to the tropical Pacific Ocean. **The Oceans are Warming**. p 101-137, 2011.

GRGEC, A. S. Potential risks and health benefits of fish in the diet during the childbearing period: Focus on trace elements and n-3 fatty acid content in commonly consumed fish species from the Adriatic Sea. **Environmental Advances**, v. 8, n. 100226, 2022.

GUTTERIDGE, J. M. C. and HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 183-186, 2018.

HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, v. 57, n. 94, p. 19-42, 1995.

HICKS, C. C. *et al.* Harnessing global fisheries to tackle micronutrient deficiencies. **Nature**, v. 574, n. 7776, p. 95-98, 2019.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.. Pesquisa da Pecuária Municipal 2020. disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e>

IPCC. Impacts - Technical Summary. **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2014.

IQUBAL, A. *et al.* Nerolidol ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, neuroinflammation and cognitive dysfunction: Plausible role of Nrf2 and NF- κ B. **Life Sciences**, v. 236, n. August, p. 116867, 2019.

JOY, S. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense responses of *E.suratensis* to acute temperature fluctuations. **Journal of Thermal Biology**, v. 70, n. October, p. 20-26, 2017.

KHALILI TILAMI, S and SAMPELS, S. Nutritional Value of Fish: Lipids, Proteins, Vitamins, and Minerals. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 26, n-2, p. 243-253, 2018.

LATINI, *et al.* Brazil's new fish farming Decree threatens freshwater conservation in South America. **Biological Conservation**. v263, p 109-353, 2021.

LIMA, D. L. G. *et al.* Morphological description of the initial development of *B. amazonicus*. **Biota Amazônia**, v. 11, n. 1, p. 60-67, 2021.

LUSHCHAK, V. I and BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen level on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 283-289, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MA, X. Y. *et al.* Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*O. niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 937-950, 2015.

MACEDO, M. N. *et al.* Land-use-driven stream warming in southeastern Amazônia. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1619, 2013.

MADEIRA, D; VINAGRE, C; DINIZ, M.S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**. v 63, p 324-331, 2016.

CREAS project. **Atmos Sci Sect AGU Newsl**, v. 2, n. 3, p. 5, 2009.

MENSINK, R. P. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. **World Health Organization**, p. 1–63, 2016.

MICHIELSEN, C. C. J. R. *et al.* Disentangling the Effects of Monounsaturated Fatty Acids from Other Components of a Mediterranean Diet on Serum Metabolite Profiles: A Randomized Fully Controlled Dietary Intervention in Healthy Subjects at Risk of the Metabolic Syndrome. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 63, n. 9, p. 1-9, 2019.

MONSERRAT, J.M. *et al.* Determination of lipid peroxides in invertebrates using the Fe (III) xylenol orange complex formation. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v45, p177–183, 2003.

MOHANTY, B. P. *et al.* Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. **Food Chemistry**, v. 293, p. 561–570, 2019.

MUGWANYA, M. *et al.* Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. **Aquaculture and Fisheries**. v 7, p 223-243, 2022.

NAVARRO, *et al.* Physiological and hematological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different anesthetics during simulated transport conditions. **Acta Sci. Technol.**, v. 38, p. 301–306, 2016.

OLIVEIRA, A. M; SILVA, N. P; ALMEIDA-Val, V. M. A. F; Val, A. L. Caracterização da atividade de piscicultura nas mesorregiões do estado do Amazonas, Amazônia brasileira. **Revista Colombiana De Ciência Animal**. v4, p154-162, 2012.

OSMOND, A.T.Y; and COLOMB, C. S. The future of genetic engineering to provide essential dietary nutrients and improve growth performance in aquaculture: Advantages and challenges. **J World Aquacult Soc**, v=50, n. 490 509, 2019.

PERNET, F. *et al.* Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: Energetics and remodelling of membrane lipids. **Journal of Experimental Biology**,

- MARENGO, J.A. Future change of climate in South America in the late 21st century: the v. 210, n. 17, p. 2999–3014, 2007.
- PHILIPPI, D. et al. High-Temperature Stress Effect on the Red Cusk-Eel (*G. chilensis*) Liver: Transcriptional Modulation and Oxidative Stress Damage. **Biology**. v 11, p 990, 2022.
- SANTOS, G; FERREIRA, E. e ZUANON, J. Peixes comerciais de Manaus. **Manaus: IBAMA/AM, Pro Várzea**. p 144, 2006.
- SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567–579, 2007.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–483, 2015.
- SOARES, M. G. M ; COSTA, E. L; SIQUEIRA-SOUZA, F. K; ANJOS, H. D. B. D. Y.; K. C.; FREITAS, C. E. C. Peixes de lagos do Médio Rio Solimões. **Rev. Manaus: Instituto Ipiatam**, v. 2, p. 160, 2008.
- SPILLER, P. *et al.* An abundance of seafood consumption studies presents new opportunities to evaluate effects on neurocognitive development. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 151, p. 8–13, 2019.
- STICHER, O. “Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten, in **Sticker Pharmacognosie Phytopharmazie**, v. 663–740, 2015.
- SWAMY, M. K; AKHTAR, M. S. AND SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evid Based Complement. Alternat. Med.**, 2016.
- TEDESCO, P. A. *et al.* Data Descriptor: A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. **Scientific Data**, v. 4, p. 1–6, 2017.
- TOCHER, D. R. *et al.* Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*O. mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 1, p. 49–63, 2004.
- TORTOLERO, S. A. R; SOARES, M. C. F; MERA, P. A. S; MONTEIRO, J. M. F. Efeito da densidade de estocagem no crescimento do matrinxã, *B. amazonicus* em gaiolas de pequeno volume. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 5, n. 1, p. 81–92, 2010

TURCHINI, G. M; TORSTENSEN, B. E; NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, n. 1, p. 10–57, 2009.

TÜRKMEN, N. B. *et al.* The Ameliorate Effects of Nerolidol on Thioastamide-induced Oxidative Damage in Heart and Kidney Tissue. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 1, 2022.

URBAN, M. C. Accelerating extinction risk from climate change. **Science**, v. 348, p. 574–573, 2015.

VIÑA, J; BORRAS, C; GOMEZ-CABRERA, M. C. A free radical theory of frailty. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 358–363, 2018.

ZANUZZO, F. S. *et al.* A description of liver and blood changes in matrinxã (*B. amazonicus*) during induced spawning. **Aquaculture**, v. 495, n. June, p. 345—350, 2018

NUP: 23081.056625/2023-73

Prioridade: Normal

Ato de entrega de dissertação/tese

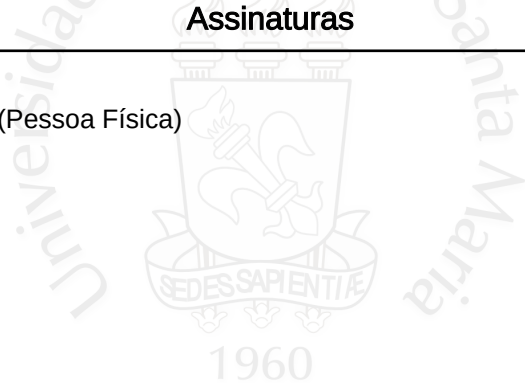
134.334 - Dissertação e tese

COMPONENTE

Ordem	Descrição	Nome do arquivo
12	Dissertação de mestrado (134.334)	DISSERTAÇÃO FINAL 23.05.pdf

Assinaturas

23/05/2023 14:28:40

LEANDRO PERGHER BOLZAN (Pessoa Física)
Usuário Externo (027.***.***.**) 



Código Verificador: 2766418

Código CRC: b4fe5c7

Consulte em: <https://portal.ufsm.br/documentos/publico/autenticacao/assinaturas.html>

