

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

Karine Ariotti

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* NO TRANSPORTE DE
ARRAIAS CURURU (*Potamotrygon wallacei*): EFEITOS EM
BIOMARCADORES TECIDUAIS**

Santa Maria, RS
2022

Karine Ariotti

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* NO TRANSPORTE DE ARRAIAS
CURURU (*Potamotrygon wallacei*): EFEITOS EM BIOMARCADORES
TECIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal da, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amália Pavanato

Santa Maria, RS
2022

Karine Ariotti

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* NO TRANSPORTE DE ARRAIAS
CURURU (*Potamotrygon wallacei*): EFEITOS EM BIOMARCADORES
TECIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal da, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 18 de agosto de 2022:

Maria Amália Pavanato, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Luciano de Oliveira Garcia, Dr (FURG)

Adriane Erbice Bianchini

Santa Maria, RS
2022

DEDICATÓRIA

A meus pais, meu irmão e minhas filhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar, guiar e fortalecer durante essa árdua batalha. Por não ter me permitido desistir e nem cair quando estive mais fraca.

Agradeço aos meus pais, Nádia e Denis, por terem sido porto seguro, abraço, carinho, esperança e paciência comigo em todos os momentos. Saibam que eu tenho noção de todas as dores e sacrifícios que causei, mas a nossa glória está perto. Tudo isso é de vocês também, AMO VOCÊS.

Agradeço ao meu irmão, Ju, por todo amor, carinho, brincadeiras, risos, choros e principalmente por compreender a distância física entre a gente. Eu sinto a sua falta todos os dias! Te amo demais.

A minha querida, amada, PACIENTE, orientadora, Maria Amália Pavanato, obrigada por ter esse lindo coração, por ter sido apoio quando precisei, puxão de orelha, compreensão e exemplo. Saiba que a senhora me ensinou muito mais do que conteúdo, me ensinou empatia, sensibilidade, seriedade e amor pelo próximo e por tudo o que faz. Um dia espero ser 5% do que a senhora foi e é para mim, para os meus alunos.

Aos colegas de laboratório que passaram e dividiram um pouco de seus conhecimentos e suas vidas comigo, meu muito obrigada! Aquelas que se tornaram grandes amigas, tenho vocês em meu coração: Isa rainha, Carolis, Vanessinha, não tenho palavras para descrever a importância de vocês nessa jornada, nesse trabalho e nos meus últimos anos.

Aos prof. Jaydione e Bernardo, que me possibilitaram junto a Maria Amália, a realização desse trabalho que tanto me apaixonei, me dediquei, tive dificuldades e muitos aprendizados. Meu muito obrigada.

Aos professores, membros efetivos e suplentes da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para a análise deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação.

À Zeli Carvalho pelos auxílios prestados, paciência e dedicação como secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

À Elisia Gomes e Rejane Foletto por todo apoio e atenção prestados durante a realização deste curso.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de realizar este curso.

Aos meus amigos e familiares que muito contribuíram com apoio psicológico, amor, atenção, carinho, risadas, inúmeros choros, paciência e fizeram meus dias melhores, amo vocês de todo o meu coração.

Por último, mas não menos importante, agradeço as minhas filhas: Docinho Maria, Florzinha Maria e Lilo Maria. Por muitas vezes vocês foram minha companhia leal, fiel, cheia de amor, pelos, latidos, lambidas e chamegos. Esse mestrado só foi possível sabendo que eu tinha o amor de vocês em casa me esperando, minha escrita com vocês se revezando no meu colo e por muitas vezes me distraíndo para a vida não ser tão pesada. Desejo que todas as pessoas um dia possam ter o prazer de sentir o amor puro que os cachorros nos dão. Amo vocês, dodí, foli e lili!

RESUMO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* NO TRANSPORTE DE ARRAIAS CURURU (*Potamotrygon wallacei*): EFEITOS EM BIOMARCADORES TECIDUAIS

AUTORA: Karine Ariotti

ORIENTADORA: Maria Amália Pavanato

O comércio de peixes ornamentais gera renda para a população ribeirinha do estado do Amazonas no Brasil. Espécies Amazônicas possuem maior procura por serem muitas vezes endêmicas, o que as valoriza. A arraia cururu (*Potamotrygon wallacei*) é uma espécie amplamente procurada para aquariofilia, tendo a exportação como principal mercado. Este trabalho investigou o impacto do transporte por longas horas na qualidade da água, resposta ao estresse, sistema de defesa antioxidante do fígado da arraia cururu e como ocorreria o processo de recuperação. Também foi estudado os efeitos do óleo essencial de *Lippia alba* (EOLA) frente as alterações impostas pelo transporte. A arraia cururu (n = 30) foram transportadas em sacos plásticos (de 3 a 4 exemplares, em cada saco) na ausência ou presença de EOLA a 10 µL/L de Manaus (Amazonas, Brasil) para Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brasil) por cerca de 32 h. Um grupo de arraia cururu foi amostrado imediatamente na chegada (n = 5 para cada condição, sem ou com EOLA). Os demais indivíduos foram mantidos por 24 h (n = 5 para cada condição, sem ou com EOLA) e 48 h (n = 5 para cada condição, sem ou com EOLA) para avaliar a recuperação da viagem. Após, foram anestesiados para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados para retirada do fígado. Um grupo de arraia cururu foi amostrado antes de iniciar o protocolo de transporte (n = 5). Amostras de água foram coletadas durante todas as etapas para monitoramento de sua qualidade. Em primeiro lugar, quando o transporte foi realizado na ausência de EOLA, resultou em níveis mais altos de amônia na água relacionada a uma resposta hiperglicêmica e um comprometimento no sistema antioxidante relacionado à glutatona caracterizado por glutatona total diminuída e subunidade catalítica dos níveis de glutamato cisteína ligase, bem como as atividades de glutatona S-transferase e glicose-6-fosfato-desidrogenase, levando o fígado da arraia cururu à peroxidação lipídica em sua chegada. O EOLA, por sua vez, evitou a maioria das mudanças induzidas pelo transporte na chegada. Além disso, também ajudou o sistema antioxidante a recuperar sua função ideal no fígado após 48 h de recuperação, acelerando o processo de recuperação que poderia levar mais de 48 h quando o transporte fosse concluído na ausência desse aditivo. Portanto, a adição de EOLA à água de transporte a 10 µL/L é altamente recomendável para o transporte de arraia cururu por mais de 30 h.

Palavras-chave: *Potamotrygonideos*. Elasmobrânquios. Linalol.

ABSTRACT

***Lippia alba* ESSENTIAL OIL IN THE TRANSPORT OF CURURU STINGRAYS (*Potamotrygon wallacei*): EFFECTS ON TISSUE BIOMARKERS**

AUTHOR: Karine Ariotti
ADVISOR: Maria Amália Pavanato

The ornamental fish trade generates income for the riverside population of the state of Amazonas in Brazil. Amazonian species are in greater demand because they are often endemic, which values them. The cururu stingray (*Potamotrygon wallacei*) is a widely sought after species for aquarium hobby, with export as the main market. This work investigated the impact of transport for long hours on water quality, stress response, antioxidant defense system of the can cururu stingray liver and how the recovery process would occur. The effects of *Lippia alba* essential oil (EOLA) were also studied against the changes imposed by transport. The stingrays cururu (n = 30) were transported in plastic bags (3 to 4 specimens, each bag) in the absence or presence of EOLA at 10 µL/L from Manaus (Amazonas, Brazil) to Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) for about 32 h. A group of cururu stingrays was sampled immediately on arrival (n = 5 for each condition, with or without EOLA). The remaining individuals were kept for 24 h (n = 5 for each condition, without or with EOLA) and 48 h (n = 5 for each condition, without or with EOLA) to assess the recovery from the trip. Afterwards, they were anesthetized for blood collection and then euthanized to remove the liver. A group of cururu stingrays was sampled before starting the transport protocol (n = 5). Water samples were collected during all stages to monitor their quality. First, when transport was performed in the absence of EOLA, it resulted in higher levels of ammonia in the water linked to a hyperglycemic response and an impairment in the glutathione-related antioxidant system characterized by decreased total glutathione and catalytic subunit of cysteine glutamate levels. ligase, as well as glutathione S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities, leading the cururu stingray liver to lipid peroxidation upon arrival. EOLA, in turn, avoided most transport-induced changes on arrival. Furthermore, it also helped the antioxidant system to regain its optimal liver function after 48 h of recovery, speeding up the recovery process that could take more than 48 h when transport was completed in the absence of this additive. Therefore, the addition of EOLA to the transport water at 10 µL/L is highly advisable when transporting cururu stingrays for more than 30 h.

Keywords: *Potamotrygonids*. Elasmobranchs. Linalool

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.2 OBJETIVOS	12
1.2.1 Objetivo geral	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 PESCA ORNAMENTAL.....	13
2.2 <i>Potamotrygon wallacei</i>	15
2.3 TRANSPORTE DE PEIXES	17
2.3.1 Parâmetros hídricos e transporte.....	17
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
2.4.1 Conceito de estresse oxidativo.....	18
2.4.2 Espécies reativas de oxigênio.....	18
2.4.3 Sistema de defesa antioxidante.....	19
2.4.4 Sistema antioxidante da glutathione.....	20
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
2.6 <i>Lippia alba</i>	24
3 ARTIGO	28
4 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são animais de uma grande variedade de espécies, cores, formatos e habitats diferentes (BUCKUP et al, 2007). No Brasil existem em média 5 000 espécies de peixes exclusivamente de água doce conhecidos, sendo a maior diversidade encontrada na região da Amazônia (REIS, 2003). Portanto, o comércio de espécies ornamentais é de grande interesse nessa região, movimentando milhões de exemplares ao ano e bilhões de dólares em todo o mundo. Por exemplo, só no ano de 2019, as exportações de espécies ornamentais movimentaram mais de 6 milhões de dólares no Brasil (EMBRAPA, 2022; SECEX, 2015; CHAPMAN, 2000; ANDREWS, 1990). Na região Norte do Brasil, mais precisamente na Amazônia brasileira, são comumente encontradas populações às margens dos grandes rios. Estas populações ribeirinhas tem como principal fonte de renda a extração de produtos amazônicos, sendo assim de grande relevância o comércio pesqueiro de espécies ornamentais (SOUZA, 2001). É estimado que apenas o Estado do Amazonas seja responsável por cerca de 90% das exportações de peixes ornamentais brasileiros, tendo gerado entre os anos de 2006 a 2015 em torno de 22 milhões de dólares (FERREIRA et al., 2020; PRANG, 2008; IBAMA, 2007; CHAO et al., 2001;).

Para o comércio legal de peixes ornamentais podem ser utilizados peixes criados em cativeiros e peixes extraídos de habitat natural. Para as extrações de habitats naturais existem regimentos vigentes pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, o IBAMA, como a normativa N - 204/2008 IBAMA, onde foram estipuladas através de estudos, cotas anuais de exportação de determinadas espécies. Dentre as cotas, temos as arraias de água doce como *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi*, *P. leopoldi*, *P. wallacei*, que possuem grande número de exemplares autorizados para a exportação; chegando a um total de 20 600 exemplares durante o período de 2008-2009 na vigência da normativa N - 204/2008 IBAMA (DUCAN et al, 2010).

A arraia de água doce *Potamotrygon wallacei*, conhecida popularmente como arraia cururu possui a maior cota de exportação, pois tem a preferência dentre as arraias comercializadas no mercado ornamental. Conhecida por seu tamanho médio, de apenas 30 cm de diâmetro, o que facilita os cuidados em ambientes menores; a coloração acastanhada clara com manchas mais escuras, tornando cada exemplar com padronagem de manchas únicas e a facilidade de ser encontrada na natureza, tornam a espécie, alvo de grande interesse para o comércio internacional. Outro fator que a torna mais apta à

exportação é a elevada resistência apresentada frente ao transporte por longas horas, o que gera grande atração para os países como Alemanha, Japão, Taiwan e Estados Unidos, pois há grandes chances de chegarem com vida em seus locais de destino (RINCON, CHARVET-ALMEIDA, 2006; ARAÚJO et al., 2005).

Mesmo com organismos capazes de resistir a longas horas de transporte as arraiais cururu ficam expostas a variáveis como: disponibilidade de oxigênio limitada, alterações de luminosidade, chances de choques físicos, privação de alimento por longo período, entre outros. Estas variáveis são possíveis geradoras de estresse oxidativo (EO) no organismo das arraiais, ou seja, o EO ocorre quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, podendo levar a interrupção da sinalização redox e do controle e/ou dano molecular (SIES, 2015). A partir desse desequilíbrio, o metabolismo celular energético é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) em altas concentrações, essas EROs são intermediários reativos radicalares ou não-radicalares formados a partir da redução parcial do oxigênio (O₂) (LUSHCHAK, 2014).

Quando há presença excessiva de EROs, podem ocorrer graves e irreparáveis danos a componentes fisiológicos e teciduais, como ao DNA, a proteínas e aos lipídios. Danos estes que podem ser capazes de levar a apoptose celular nos organismos. No entanto os seres aeróbicos, possuem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas que podem combater os processos que são mediados pelo excesso de EROs (PAVANATO e LLESUY, 2008; LUSHCHACK, BAGNYUKOVA, 2006.).

A pesca e comércio de peixes ornamentais são antigas no Brasil, tendo no ano de 1955 os primeiros registros desses tipos de práticas. Ainda que antiga, são necessárias melhorias nas técnicas de transporte afim de que seja possível diminuir os danos impostos aos animais durante as viagens de exportação (CHAO et al., 2001). Estas melhorias envolvem a utilização de técnicas de sedação como a exemplo os estudos com OE de *Lippia alba* onde já foi demonstrada eficácia e apresentaram diminuições do estresse no transporte de jundiás (*Rhamdia quelen*) por diferentes tempos (BECKER et al., 2012; AZAMBUJA et al., 2011). Em outro estudo foram testados os usos de tetraciclina e do probiótico Efinol® no transporte de *P. wallacei* na tentativa de reduzir os danos causados durante a viagem, mas não foram obtidos dados significativos de proteção e melhora dos animais, portanto sugerimos o uso do EO de *L. alba* para o transporte de *P. wallacei* (BRINN et al., 2012)

Sendo assim, este trabalho procurou avaliar através de biomarcadores de estresse oxidativo em fígado e plasma da arraia *P. wallacei* a eficácia da adição do OE de *L. alba*

como alternativa para aumentar o bem-estar e minimizar perdas durante os transportes de longas distâncias.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar como a arraia cururu (*Potamotrygon wallacei*) responde fisiologicamente ao estresse ocasionado pelo transporte de longas horas de duração com e sem adição do EO de *Lippia alba* na água do transporte.

1.2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar os parâmetros de qualidade de água nos grupos transportados com e sem adição do óleo essencial de *Lippia alba*.

2) Avaliar as atividades da glicose e da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma das arraias cururu em diferentes tempos com e sem EO *L. alba*.

3) Determinar o conteúdo de antioxidantes não enzimáticos como a glutatona total, ácido ascórbico (AA) e capacidade antioxidante total (TAC) em homogeneizados de fígado de arraias cururu dos diferentes grupos.

4) Avaliar a síntese da glutatona através da cisteína e da subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase (GCLc), em homogeneizados de fígado de arraias cururu dos diferentes grupos.

5) Avaliar enzimas relacionadas a glutatona como: glutatona S-transferase (GST) e Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) nos diferentes grupos experimentais.

6) Determinar os níveis de lipoperoxidação (LPO) através da medida de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em homogeneizados de fígado de arraias cururu transportadas com e sem adição de EO de *L. alba*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMÉRCIO E PESCA ORNAMENTAL

O comércio de peixes ornamentais é uma importante área geradora de receita, principalmente para países em desenvolvimento e com grande diversidade de fauna, como o Brasil. Cerca de 2500 espécies de peixes estão catalogadas mundialmente para este uso, sendo 60% dessas espécies estritamente de água doce. Este tipo de comércio envolve muito mais que apenas os animais, pois também são contabilizados acessórios, equipamentos, alimentação, plantas ornamentais para montar os aquários, limpeza, etc. O ano de 2011 foi considerado o ápice de movimentação de dinheiro do comércio ornamental, uma vez que foi gerado um montante de US \$ 364,9 milhões. Em compensação nos anos seguintes, entre 2014 e 2018, análises feitas demonstraram uma pequena queda de rendimento, tendo gerado entre US \$ 347 e 338 milhões, novas leis de monitoramento e conservação podem ter contribuído para essa baixa de rendimento (BIONDO e BURKI, 2020; OEC, 2020; DEY, 2016; PLOEG 2013; PRANG, 2007).

Nos anos entre 2000 e 2014 o ranking de importadores consistiu em: Alemanha, Cingapura, Japão, China, França, Holanda, Itália, Malásia, Canadá e Bélgica. Uma análise feita apenas no ano de 2014, foram detectados que mais de 57% das importações foram feitas com países orientais, 27,6% europeus, 7,5% sul-americanos, 3,98% norte americanos, 2,2% africanos e 1,72% com países da Oceania e Oriente Médio (DEY, 2016).

O Brasil já foi o principal exportador mundial, mas na última década foi responsável por apenas 5,9% do total de exportações mundiais. Uma das causas dessa diminuição brasileira de exportação é que cerca de 90% das espécies de peixes ornamentais de água doce estão conseguindo ser reproduzidas em cativeiros localizados em outros países e apenas 10% das espécies ainda dependem do extrativismo de pescadores. A região onde a pesca ornamental é de fundamental importância para os moradores ribeirinhos, é a região Amazônica, nela estão inclusos o Brasil, a Colômbia e o Peru. No Brasil, a principal região é a Bacia Amazônica, composta pelos estados do Amazonas e do Pará. A região é responsável por cerca de 88% do valor exportado pelo Brasil anualmente (ROSSONI et al., 2014; PLOEG, 2013; GADELHA, 2010; ANJOS et al., 2009; CHAPMAN, 2000).

A produção brasileira de peixes ornamentais consiste em extrativismo feita por uma cadeia de trabalhadores. A cidade de Barcelos no Amazonas tem cerca de 60% de sua renda proveniente dessa cadeia produtiva. A extração é feita por pescadores artesanais, que capturam os animais, mas geralmente não possuem muitos recursos para transporte e armazenamento de qualidade. Os pescadores, passam para o ‘pescador padrão’, que possui mais condições e que consegue ser o intermediário para as importações. E por último, temos os distribuidores/exportadores que fazem a ligação com os compradores nacionais e internacionais (FERREIRA et al., 2020; MONTICINI, 2010; SANTOS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2009).

A atividade de exportação de espécies ornamentais no Brasil é regularizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sendo a primeira regulamentação instituída em 1998 pela portaria nº 022/98 do IBAMA. Portaria essa que é revista de tempos em tempos, onde a última atualização foi datada em 2008 na instrução normativa 204/2008. Dados provenientes da Coordenação dos Recursos Pesqueiros do IBAMA (COREP/CGFAP/DBFLO/IBAMA, 2016) entre os anos de 2006 e 2015 nos dá a seguinte tabela de quantidade de peixes de água doce exportados pelo Brasil:

Tabela 1

ANO	QUANTIDADE
2006	28 087 926
2007	27 086 888
2008	24547290
2009	20 716 715
2010	15 845 311
2011	11 265 973
2012	8 155 060
2013	8 722 366
2014	7 245 788
2015	3 012 427
TOTAL	154 685 744

FONTE: Adaptada de Ferreira et al., 2020.

O peixe cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, é o mais comercializado ornamentalmente pelo Amazonas, é responsável por cerca de 80% das exportações. Outro grupo que possui muita procura e tem um alto valor comercial para exportação, são as arraias de água doce da família Potamotrygonidae. Para esta família foi necessária a criação de cotas anuais para exportação, onde se prevê a proteção das espécies, o equilíbrio ecológico e a manutenção da população das arraias. Estas cotas existentes desde 2008 visam diminuir os impactos e tentar coibir a biopirataria destas espécies que muitas vezes são endêmicas da região amazônica. (ANJOS et al., 2009; PRANG, 2007; CHAO et al., 2001).

2.2 *Potamotrygon wallacei*

As arraias são classificadas como peixes cartilaginosos assim como os tubarões (Classe Elasmobranchii). Estes animais possuem grande diversidade de exemplares: de gigantes marítimos (arraias manta) à anãs de água doce (arraias cururu). Com ampla distribuição na América do Sul e região Amazônica, encontramos a família Potamotrygonidae, com exemplares na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (LASSO et al., 2016).

Os gêneros conhecidos desta família são: *Plesiotrygon*, *Paratrygon*, *Potamotrygon* e *Heliotrygon*. Sendo o gênero *Potamotrygon* o que possui o maior número de espécies descritas, dentre elas está a *Potamotrygon wallacei*, conhecida popularmente como arraia cururu (CARVALHO et al., 2016; CARVALHO, LOVEJOY, 2011).

Antes da descrição correta, vários nomes acabaram sendo utilizados de forma errada para se referir a *P. wallacei*. Por longos anos, livros, revistas e artigos citavam-na como *Potamotrygon sp.* ou como *P. hystrix* (ou *P. hystrix*), como em publicações de Müller e Henle (1836), e até em Brinn et al (2012). Mas Carvalho et al. (2003) e Rosa et al. (2016), conseguiram delimitar que a espécie *P. hystrix* é endêmica da bacia do rio Paraná-Paraguai, portanto, não ocorrendo na região amazônica, região onde *P. wallacei* é unicamente encontrada.

Carvalho e colaboradores (2016) a descreveram como uma arraia anã, possuindo em média 30 cm de diâmetro quando adulta. Suas cores do dorso são variáveis, mas distintas. As arraias cururus possuem dorso com fundo acastanhado, marrom, ou acinzentado com marrom; manchas irregulares de coloração marrom escura ou pretas. Por outro lado, seu ventre é branco, sendo possível a presença de manchas com coloração

marrom quando em fase adulta. Neonatos e juvenis, apresentam coloração mais clara do que em fase adulta.

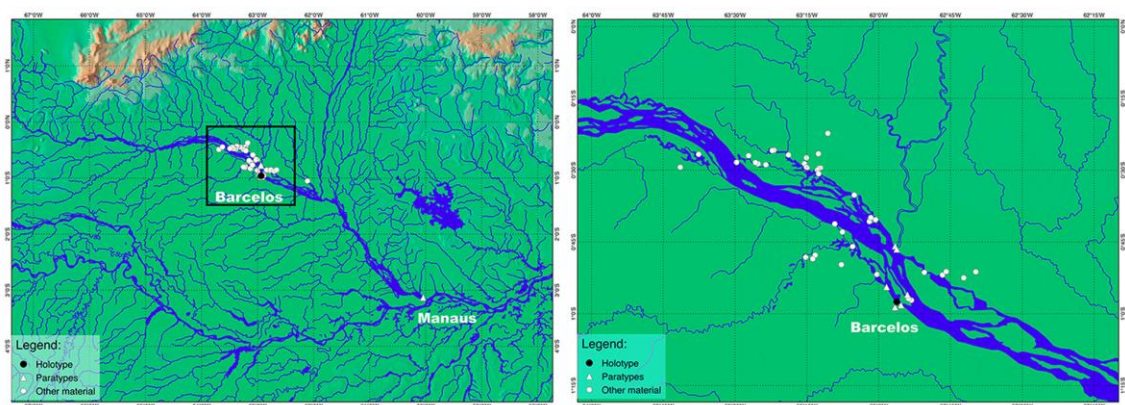
Fig 1. Indivíduo de *P. wallacei*.



FONTE: Karine Ariotti

A espécie *P. wallacei* é endêmica da bacia do Rio Negro, distribuindo-se da cidade de Santa Isabel do Rio Negro até as proximidades da capital do estado do Amazonas (Manaus, Brasil). Elas têm como habitat as águas negras de pH ácido e baixos níveis de oxigênio do Rio Negro. De hábito bentônico, são encontradas enterradas nas areias perto das margens de igarapés e igapós, que são pequenos afluentes do Rio Negro, com águas escuras e com fundos arenosos e folhosos (CARVALHO et al., 2016; DUNCAN e FERNANDES, 2010).

Fig 2. Região do Rio Negro onde a *P. wallacei* é endêmica.



Fonte: Adaptado de Carvalho et al., 2016.

Animais de metabolismo lento e de alimentação generalista, as arraiais desta espécie se alimentam principalmente de caranguejos (Trichodactylidae), camarões (Euryrhyndidae), libélulas (Gomphidae) e em menor quantidade, peixes teleósteos e anelídeos (SHIBUYA et al. 2020; DUNCAN et al. 2016).

2.3 TRANSPORTE DE PEIXES

2.3.1 Parâmetros hídricos e transporte

Ambientes aquáticos possuem parâmetros bióticos e abióticos necessários para o bem-estar dos animais que ali habitam. Entretanto quando em situação de transporte a água tende a perder sua qualidade, levando a possíveis danos fisiológicos e até mesmo ocasionar a morte. Sendo assim, os parâmetros abióticos ou químicos de qualidade de água são verificados e analisados para monitorarmos as condições do ambiente. A quantidade de oxigênio dissolvido (OD), a temperatura, a amônia e o potencial hidrogeniônico (pH), são exemplos de parâmetros hídricos abióticos amplamente estudados. (SILVA et al., 2015; RAMÍRES-DUARTE et al., 2013; HARMO, 2009; LIM et al., 2003; TEO et al., 1989; BOWER e TURNER, 1982).

Os parâmetros abióticos de qualidade de água são variáveis dependentes do local em que cada espécie está ambientada. Diferentes ambientes apresentam diferentes características de qualidade da água, como as águas do Rio Negro na Amazônia, a qual possui pH ácido, temperatura alta, coloração escura e baixos níveis de OD, diferente de águas encontradas nos estados da região Sul do Brasil. Além disso, um parâmetro está intimamente ligado ao outro, a amônia, por exemplo, pode alterar e ser alterada pelo pH e a temperatura da água. Altos níveis de amônia podem se tornar tóxicos e até letais aos peixes de água doce. (OLIVEIRA et al., 2008; THURSTON et al., 1981).

Vanderzwalmen, et al. 2021, estudaram as possíveis alterações fisiológicas e comportamentais nos peixes ornamentais *Paracheirodon innesi*, *Carassius auratus* e *Xiphophorus variatus*, em consequência das mudanças na qualidade de água nas diferentes etapas da cadeia de transporte. Foi detectada que a qualidade da água teve grandes oscilações dos parâmetros, mesmo que ainda estivessem dentro dos níveis considerados seguros, o que possivelmente foi uma fonte de estresse e mudanças não só

fisiológicas, mas também comportamentais dos peixes, os deixando com nados erráticos e até mordidas entre eles.

Sampaio e Freire (2016) demonstram em seus estudos que através dos parâmetros químicos podemos constatar os níveis de deterioração da água no transporte de peixes. Em transportes de curto tempo, estipulados como menor que 8h, o decréscimo do pH foi o parâmetro mais preocupante pois não houve tempo para o reestabelecimento de níveis considerados bons, mas em transportes de longa distância, estabelecido como maiores que 8h, os níveis de amônia passaram a ser mais prejudiciais por conta do depósito que ocorre na água ao longo das horas transportadas. Estes estudos citados, demonstram a importância do monitoramento da qualidade da água, para a manutenção da homeostasia e bem estar dos peixes.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

2.4.1 Conceito de estresse oxidativo

O conceito de estresse oxidativo foi formulado e introduzido na medicina por Helmut Sies no ano de 1985, consistia em “um distúrbio no equilíbrio entre prooxidantes e antioxidantes em favor do primeiro”. Em meados dos anos 80, o enfoque estava apenas nos danos oxidativos nas células e nos órgãos. Com o passar dos anos e intensificação dos estudos na área, descobertas da detecção, regulação e sinalizações redox, a definição de 1985 ficou obsoleta, tornando necessária uma redefinição, o novo conceito diz que “o estresse oxidativo consiste num desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular.” (SIES, 2018, 2017; JONES, 2016; SIES e CADENAS, 1985)

A tecnologia avançando com o decorrer dos anos, torna mais detalhada a definição de estresse oxidativo, trazendo novas classificações e o tornando mais específico. A classificação através de escalas de intensidade é utilizada, sendo o estresse oxidativo a nível fisiológico denominado de eustress e o distress, onde a carga oxidativa é tóxica a nível de danos em biomoléculas. Sendo assim, se há uma dicotomia, onde a baixa exposição de células e organismos é utilizada para sinalização redox abordando alvos em

específicos, enquanto a alta exposição resulta em interrupção da sinalização redox e/ou danos a alvos inespecíficos (SIES, 2018).

2.4.2 Espécies reativas de oxigênio

Animais aeróbios fazem a utilização do oxigênio molecular (O_2) para a manutenção de sua energia vital. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas normalmente como parte do metabolismo celular, podendo ser utilizadas como mediadoras de respostas biológicas como a senescência e a apoptose. As mitocôndrias são responsáveis pelo consumo de O_2 e pela produção da maior parte das EROs no corpo. Através das reduções parciais do O_2 formam-se os intermediários radicalares como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e a hidroxila (OH^{\bullet}), e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2). (WINTERBOURN, 2015; LUSHCHAK, 2014; FRANSEN et al., 2012; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser proveniente da redução do oxigênio molecular formado durante a respiração na mitocôndria, da atividade enzimática da xantina oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, autooxidação de catecolaminas entre outros. Não é tão reativo, mas quando combinado com H_2O_2 tende a tornar-se mais reativo. O radical hidroxila (OH^{\bullet}) pode ser gerado através do H_2O_2 e de reações como a de Fenton, onde é catalisada pelo Fe^{2+} . Possui vida média curta, mas grande reatividade, reagindo rapidamente com moléculas ao seu redor, de aminoácidos a lipídios e proteínas. (JONES, 2016; PISOSCHI; POP, 2015; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser gerado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, pela degradação de metabólitos peroxissomais ou diretamente através da transferência de dois elétrons de oxidases como a glicose oxidase, para o oxigênio molecular. É considerado pouco reativo. Já a forma mais reativa do O_2 , o oxigênio singlete (1O_2), que possui as ligações duplas como as encontradas nos ácidos graxos poliinsaturados, como alvo principal e sua formação em reações de fotossensibilização. (PISOSCHI; POP, 2015; FRANSEN et al., 2012; ANTONENKOV et al., 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DIPLOCK et al., 1998).

2.4.3 Sistema de defesa antioxidante

As EROs podem ser responsáveis por danos ao organismo, como por exemplo o seu excesso desencadeia a lipoperoxidação (LPO), onde são formados os hidroperóxidos de lipídios responsáveis por decompor as ligações duplas de ácidos graxos, levando a oxidação dos fosfolipídios das biomembranas alterando seu funcionamento secretor e sua conformação, fluida (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O sistema antioxidante atua no organismo afim de manter os níveis fisiológicos da EROs normais. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, tem a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação do substrato. São encontrados antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos nos organismos, agindo conjuntamente para a proteção do organismo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Esse sistema age em resposta ao desafio oxidativo presente, através de uma sinalização redox capaz de ativar a expressão gênica e de combater o desafio imposto. Dois dos principais reguladores são os sistemas Nrf2/Keap1 e o NF- κ B/I κ B, que são capazes de ativar enzimas de defesa e a expressão de genes de respostas inflamatória, imune e de fase aguda (SIES, 2018; WU et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2002).

A primeira linha de defesa é composta por enzimas, como por exemplo da glutathione S-transferase (GST) que é capaz de realizar a remoção catalítica do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , evitando a formação de mais EROs e mantendo a concentração aceitável a níveis fisiológicos. Já o sistema de defesa não enzimático é composto por moléculas que protegem os alvos biológicos da oxidação, sendo estas do próprio organismo, moléculas exógenas, naturais ou sintéticas. Podem ser moléculas hidrossolúveis a exemplo do ácido ascórbico (AA) e podem suprimir, desativar ou eliminar as EROs (WU et al., 2020; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005; SIES, 1999).

2.4.4 Sistema antioxidante da glutathione

O sistema antioxidante da glutathione é controlado pelo fator de transcrição chamado fator 2 que é relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), o qual é grande responsável pela homeostase celular. A glutathione (GSH) está presente em todos os tecidos dos mamíferos, em variadas concentrações, tendo sua maior concentração localizada no fígado. É caracterizada como um tripeptídeo de baixo peso molecular e com

inúmeras funções em diversos processos celulares (TONELLI et al., 2018; MUKAIGASA et al., 2012; LU, 2009).

Uma das enzimas responsáveis pela sintetização da GSH é uma proteína sensível ao estresse oxidativo, a glutamato cisteína ligase (GCL). A GCL é composta por duas subunidades: uma catalizadora e outra moduladora. A subunidade catalizadora (GCLc) possui um sítio ativo responsável pela união do grupo amino da cisteína e o grupo γ -carboxílico do glutamato; e uma subunidade moduladora (GCLm) que possui função reguladora que aumenta a eficiência catalítica da GCLc. A outra enzima responsável é a glutathione sintase (GS), caracterizada como um homodímero com ação catalisadora de adição da glicina a γ -glutamilcisteína formada anteriormente pela GCL (GIUSTARINI et al., 2013; VULCANO et al., 2013; WILD et al., 1999; GAITONDE, 1957).

O Nrf2 é responsável pela regulação da transcrição de enzimas desintoxicantes de EROs e xenobióticos, incluindo algumas glutathione S- transferases (GSTs). As GSTs são enzimas que usam a GSH, gerando glutathione oxidada, a qual posteriormente é reduzida pela glutathione redutase (outro alvo da Nrf2), via dependente de NADPH, a GSH novamente. Assim como a produção de NADPH também é regulada pelo Nrf2 via regulação positiva de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (WU et al., 2011; HARVEY et al., 2009; CHANAS et al., 2002; HABIG et al., 1974; GLOCK et al., 1953).

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (EO de *essential oil*) são substâncias formadas por metabólitos secundários nas plantas aromáticas e odoríferas, geralmente líquidas e altamente voláteis. São oriundas de partes vegetais, como folhas, caules, flores, raízes, cascas, sementes, frutas, rizomas ou até a planta inteira (HYLDGAARD et al., 2012). Segundo Ríos (2016) os EO tendem a ser incolores a amarelados em temperatura ambiente, ter odor característico e facilmente absorvido pela pele. Geralmente possuem baixa densidade e pouca solubilidade em água, sendo solúveis em solventes como o etanol e éter etílico.

No mundo, temos inúmeras definições de EO, mas a mais aceita e utilizada é a da International Organization for Standardization (ISO), que definiu como “produto obtido a partir de matéria-prima natural de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos do epicarpo de frutas cítricas, ou por destilação a seco, após a separação da fase aquosa - se houver - por processos físicos”, logo, “o EO pode ser submetido a

tratamentos físicos, que não resultam em qualquer alteração significativa em sua composição”. Já Sonwa (2000) resume a definição dada por Schilcher, Hegnauer e Cohn-Riechter em: “Os EO são produtos ou misturas de produtos, que se formam no citoplasma e estão normalmente presentes na forma de minúsculas gotículas entre as células. São voláteis e aromáticos”. Sendo essa, a definição botânica e generalizada a inúmeras plantas, não exclusivamente as cítricas.

Os vegetais tem seus compostos divididos em dois tipos de metabólitos: os primários e os secundários. Os metabólitos primários consistem em compostos encontrados em todas as células vegetais e importantes para o desenvolvimento dos mesmos. Eles são responsáveis por funções vitais, como por exemplo: a fotossíntese, a assimilação de nutrientes, o transporte de solutos e a respiração. Já os metabólitos secundários são também conhecidos como ‘metabólitos especiais’, pois são responsáveis pela interação das plantas com o ambiente ao seu redor (GOTTILIEB e BORIN, 2012; SOUZA et al., 2010).

Os metabólitos secundários possuem inúmeras funções de interação entre planta-ambiente. As mais conhecidas são: alelopatia (supressão do crescimento das plantas vizinhas); proteção através da ação tóxica contra bactérias, fungos, vírus, insetos e animais herbívoros; assim como também pode atrair polinizadores específicos para a dispersão do pólen da planta; e por último, ter ações específicas em células da própria planta, como na resistência à salinidade do solo que seria altamente tóxica a vegetais não especializados (COELHO, 2009; PICHERSKY e GANG, 2000).

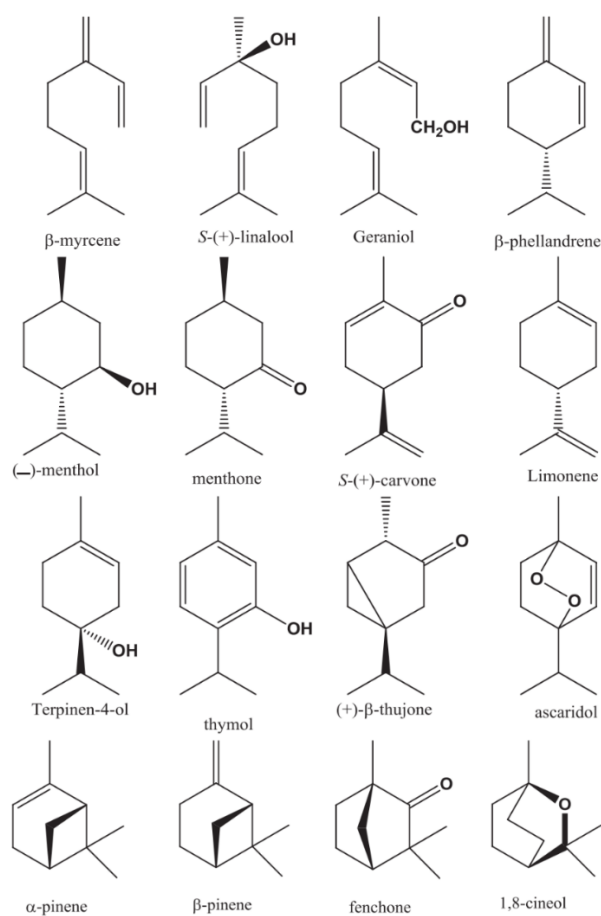
Como já citado anteriormente os EO são oriundos de folhas, caules, flores, raízes, cascas, sementes, frutas, rizomas ou até a planta inteira. Em muitas plantas eles são sintetizados e armazenados em células indiferenciadas como em Lauraceae; em órgãos secretores, como tricomas glandulares em Lamiaceae e Asteraceae; em ductos secretores esquizógenos em Myrtaceae e esquizolisígenos em Rutaceae; ou cavidades como em Coníferas (HEINZMANN et. al., 2016; HYLDEGAARD et al., 2012).

A obtenção dos EOs podem variar de acordo com a localização do óleo na planta e com a sua utilização; podem ser feitas por: hidrodestilação onde o material vegetal picado é submerso e em contato direto com água fervente; destilação a vapor na pressão atmosférica, onde uma caldeira separada do destilador produz o vapor; destilação a vapor de alta pressão; destilado condensado, onde há mistura de água e óleo, e separado por prensagem a frio; prensagem a frio, processo que esmaga mecanicamente as glândulas

sebáceas das cascas das frutas cítricas para a liberação do conteúdo. Dentre estes, o mais comum em grande escala é a destilação a vapor que apresenta bons rendimentos, fácil execução e baixo custo (HEINZMANN et. al., 2016; SELL, 2010).

Os EOs são misturas complexas de compostos naturais (de 20 a 200 componentes), extremamente voláteis, lipofílicas, de baixo peso molecular, geralmente odoríferas, líquidas, com aparência oleosa à temperatura ambiente. Apesar de muitos componentes, sempre há um, dois ou três em porcentagem majoritária e muitos deles sendo apenas encontrados em traços. Dentre os majoritários mais encontrados, temos os terpenoides (Fig 3) e seus derivados de baixo peso molecular. Estes compostos representam uma ampla classe de substâncias formadas pela condensação de diferentes unidades de isopreno (C_5H_{10}). Os monoterpênicos e sesquiterpenoides são os terpenoides que aparecem com mais frequência nos EOs (HEINZMANN et. al., 2016; SELL, 2010; PASCUAL et al., 2001).

Fig 3. Terpenoides.



Fonte: Adaptado de Essential Oils: Concept, Chapter 1 de José-Luís Ríos.

A composição e concentração de EO é determinada geneticamente, mas fatores climáticos (temperatura e umidade relativa do ar), composição do solo, interação com outras plantas e o ciclo vegetativo também alteram a variabilidade química (MORAIS, 2009; MASOTTI et al., 2003).

Os EOs podem ser considerados como os primeiros medicamentos que foram utilizados pelo homem primitivo contra algumas doenças que os acometiam, mas até hoje eles vem sendo amplamente utilizados na medicina popular, mas agora também são inclusos nas indústrias cosméticas (perfumes, sabonetes, xampus, géis de limpeza), farmacêuticas (como excipientes e princípios ativos) e alimentícias (produção de bebidas e aromatizante de alimentos) (SANTOS, 2019; RÍOS, 2016).

Inúmeras atividades já foram detectadas e muito bem estudadas: antibacteriana, antifúngica, antiviral, ansiolítica, antidepressiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica e repelente (MALEK et al, 2021).

2.6 *Lippia alba*

A espécie *Lippia. alba* (Mill.) N. E. Brown pertence a classe Magnoliopsida, ordem Lamiales, família Verbenaceae e gênero *Lippia*. A família Verbenaceae possui cerca de 34 gêneros e 1.035 espécies descritas no mundo. Espécies estas encontradas em diversas áreas do planeta: de áridas, semiáridas, a florestas tropicais úmidas e secas e a altas e baixas altitudes. As plantas representantes desta família têm diversos usos na medicina popular, principalmente nos povos da América Latina; podem ser utilizados como agentes digestivos, anti-sépticos, tratamentos de infecções bacterianas como sinusites e bronquites e de febres (CARDOSO et al. 2021; Lista da Flora do Brasil, 2020; The Plant List, 2020).

O gênero *Lippia* possui cerca 250 espécies, sendo considerado o segundo maior gênero da família Verbenaceae. A sua distribuição é ampla, encontrada em países da América Central, América do Sul e África Tropical. Conhecidas popularmente na América Latina por erva cidreira, erva-cidreira-de-campo, cidrila, cidreira-brava, alecrim-selvagem, alecrim-do-campo, alecrim-de-tabuleiro, alecrim-pimenta, alecrim-da-chapada, alecrim-de-serrote, falsa-melissa, salva-do-brasil, salva-limão, salvia

morada, carmelita, erba sagrada. Sendo estes nomes dados para várias espécies diferentes dentro do gênero *Lippia*, como por exemplo: *Lippia alba*, *L. origanoides*, *L. sidoides*, *L. gracilis*, *L. brasiliensis*, etc. (PASCUAL et al 2001; TERBLANCHE e KORNELIUS, 1996)

Fig 4. Exemplar de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.



Fonte: <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/lippia-alba-mill-n-e-br-ex-britton-p-wilson> (Sandra Zorat Cordeiro)

A espécie *L. alba* é caracterizada como um subarbusto de aproximadamente 1,5 metros de altura, com morfologia variável, espécie nativa da maioria das regiões brasileiras. Possui ramos finos, longos e quebradiços, esbranquiçados e com folhas inteiras, opostas, de bordos serrados, com uma fina pilosidade e ápice agudo. As inflorescências são azul-arroxeadas, axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável e seus frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas. Possui crescimento em locais variados, desde as margens de rios, lagos e lagoas, a solos arenosos. Mudanças morfológicas, anatômicas, fitoquímicas e genéticas podem ocorrer em função dos diferentes meios em que a espécie pode ser encontrada (STEFANINI et al., 2002; GOMES 1993).

Por estar localizada em uma ampla área territorial da América Latina, possui inúmeros nomes populares conhecidos como já citados anteriormente. A *L. alba* em específico, tem como nomes mais populares no Brasil, falsa-melissa, cidreira, erva-cidreira, alecrim-selvagem, cidreira-brava, salva, salva-limão, salva-brava, entre outros. A família Verbenaceae, a qual o gênero *Lippia* está incluso, possui usos tradicionais e comuns na medicina popular, como analgésico, antipirético, sedativo, antiespasmódico,

antiinflamatório e uso na indústria agroquímica, por conta do seu odor aromático e agradável, sendo utilizada tanto na indústria de cosméticos, alimentos e na indústria agroquímica, onde pode atuar como inseticida e repelente (HENNEBELLE, 2008; YAMAMOTO et al., 2006; PASCUAL et al., 2001).

Diversas dessas propriedades são dadas pelos compostos dos metabólitos secundários dessas plantas, os quais são responsáveis pela composição dos seus óleos essenciais (EO). O EO de *L. alba* é amplamente estudado no meio acadêmico, onde foi capaz de descrever inúmeros constituintes ativos presentes, como por exemplo os monoterpenoides (linalol, limoneno, geranial, entre outros) e os sesquiterpenoides (β -cariofileno, entre outros) (PASCUAL et al 2001). Estudos feitos por Souza et al, 2019 analisaram duas concentrações de EOs de *L alba* com compostos majoritários diferentes, um do quimiotipo linalol e outro com o quimiotipo citral, como anestésicos em jundiás (*Rhamdia quelen*). Os dois EOs evitaram o aumento do cortisol plasmático e também evitaram os danos lipídicos. Mas o quimiotipo linalol demonstrou ser menos danoso as proteínas que o citral, sendo assim, o mais indicado anestésico nestes peixes.

O período de colheita das plantas para a obtenção do EO, pode levar a termos compostos diferentes na mesma planta. Estudos de Gomes et al, 2019 demonstraram que os compostos podem variar durante as estações, assim como em meses diferentes. EOs de *L. alba* com carvona e linalol apresentaram variação nos metabólitos, sendo o acetosídeo o principal metabólito detectado de julho a novembro e a tricina-7-O-diglucuronida o principal composto nos meses restantes. Outra mudança encontrada foi a predominância dos fenilpropanóides no período de inverno e dos flavonóides no verão.

O EO de *L. alba* de quimiotipo linalol majoritário é encontrado em plantas cultivadas na região Sul do Brasil (HELDWIN, 2012). Hohlewerger, 2017, realizou um estudo com tilápias-do-Nilo, com adição de EO de *L. alba* em sacos para transporte, onde os níveis de glicose no plasma foram reduzidos, assim como os níveis de amônia não-ionizada nas águas de transporte, ocasionando menos danos e estresse aos animais transportados.

Azambuja et al, 2011, realizou estudos com transporte de espécies juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), por tempos de viagem diferentes (5, 6 e 7h) com a adição de EO de *L. alba* e sem adição nos sacos de transporte. Os resultados encontrados demonstraram que a presença do EO diminuiu a lipoperoxidação no fígado e nas brânquias durante o transporte por 5h. Assim como também diminuiu a catalase, e a

glutathione-s-transferase, medidas nos fígados dos peixes transportados por 5 h. A partir deste estudo, então se sugere que a presença do EO melhorou o estado redox nos tecidos avaliados em questão, tanto sob hiperóxia quanto sob hipóxia gerados no transporte.

3. ARTIGO

***Lippia alba* essential oil improves the water quality during transport and accelerates the recovery of cururu stingray (*Potamotrygon wallacei*) from the transport-induced stress and changes in its liver antioxidant system**

Artigo publicado no periódico: **Aquaculture**.

Acessível online: 13 de julho de 2021 doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737176



Lippia alba essential oil improves water quality during transport and accelerates the recovery of *Potamotrygon wallacei* from the transport-induced stress

Karine Ariotti^a, Jaydione L. Marcon^b, Isabela A. Finamor^a, Caroline A. Bressan^a, Cristiano L. de Lima^c, Carine de F. Souza^a, Bráulio O. Caron^d, Berta M. Heizmann^e, Bernardo Baldisserotto^a, Maria A. Pavanato^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste, Manaus, AM, Brazil

^d Departamento de Ciências Agrônomicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul, Frederico Westphalen, RS, Brazil

^e Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cururu stingray
Additive
Ammonia
Glucose
Antioxidant
Liver

ABSTRACT

The current work investigated whether the long transport could impact the water quality, the response to stress, the antioxidant defense system in cururu stingray (*Potamotrygon wallacei*) liver, and how a recovery process could affect them. Furthermore, it also examined the effects of the *Lippia alba* essential oil (EOLA) on these transport-induced changes. For this purpose, the cururu stingray ($n = 30$) were transported in plastic bags (from 3 to 4 specimens, each bag) in the absence or presence of EOLA at 10 $\mu\text{L/L}$ from Manaus (Amazonas, Brazil) to Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) for about 32 h. A set of cururu stingray was sampled immediately at the arrival ($n = 5$ for each condition, without or with EOLA). The remaining individuals were kept for 24 h ($n = 5$ for each condition, without or with EOLA) and 48 h ($n = 5$ for each condition, without or with EOLA) to assess their recovery from the trip. After it, they were anesthetized for blood collection, and then, euthanized for liver removal. A set of cururu stingray was sampled before starting the transport protocol ($n = 5$). Water samples were collected during all steps for monitoring its quality. First of all, when the transport was carried out in the absence of EOLA, it resulted in higher ammonia levels in water linked to a hyperglycemic response, and an impairment in the glutathione-related antioxidant system characterized by decreased total glutathione, and catalytic subunit of glutamate cysteine ligase levels as well as glutathione S-transferase, and glucose-6-phosphate-dehydrogenase activities, thus leading the cururu stingray liver to lipid peroxidation at its arrival. The EOLA, in turn, avoided most transport-induced changes at the arrival. Furthermore, it also helped the antioxidant system to retrieve its optimal function in the liver after 48 h recovery, speeding up the recovery process that could take more than 48 h when transport was completed in the absence of this additive. Therefore, the addition of EOLA to the transport water at 10 $\mu\text{L/L}$ is highly advisable when transporting cururu stingray for more than 30 h.

1. Introduction

The ornamental fish trade is immense and an important component of the global industry, generating a revenue of USD 338 million in 2018 without considering the related accessories (OEC, 2018). It represents about 2 billion ornamental live fish air-shipped worldwide every year,

including freshwater and marine species (Monticini, 2010). They generally travel long distances, being transported in sealed plastic bags inflated with pure oxygen and experiencing, during this process, high-stress levels and prolonged recovery (Lim et al., 2003). Among them is *Potamotrygon wallacei* (*P. wallacei*), also known as “cururu stingray”, an elasmobranch found exclusively in freshwater, which is endemic to a

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: maria.amalia@ufsm.br (M.A. Pavanato).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737176>

Received 24 February 2021; Received in revised form 2 June 2021; Accepted 11 July 2021

Available online 13 July 2021

0044-8406/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

small portion of the Rio Negro, a large affluent of the Rio Amazonas, in Brazil. They are targeted by the ornamental industry primarily due to their high level of polychromatism and economic value (Carvalho et al., 2016; Chao, 2001).

Although it is recognized that transport is a stressful situation for several ornamental fish species (Lim et al., 2003), it is still unknown whether it could affect the antioxidant responses in the cururu stingray (*P. wallacei*) liver and how much time it would take for its total recovery. There is only one investigation assessing the cururu stingray (*Potamo-trygon cf. hirtix*) responses to stress during transport, and it revealed that this condition triggered an increase in the corticosterone levels over time and also provoked osmoregulatory disturbances (Brinn et al., 2012). Based on this background, these authors also looked for additives as probiotics and antibiotics to minimize these changes, showing that they did not reduce the stress-related responses and should be avoided (Brinn et al., 2012). Thus, there is a growing interest in compounds that could be effective in reducing transport-associated stress.

Among them is the essential oil of *Lippia alba* (*L. alba*) (Mill.) N.E. (EOLA). Its addition to the transport water has been beneficial to teleosts, improving the water quality (Becker et al., 2012; Hohlenwerger et al., 2017; Sena et al., 2016), stress level (Hohlenwerger et al., 2017; Sena et al., 2016), and also their liver antioxidant responses (Azambuja et al., 2011; Salbego et al., 2017). Nevertheless, its properties on the elasmobranchs are not known at all. Therefore, the current work aimed to investigate whether the long transport (from Manaus, Amazonas, Brazil to Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) could impact the water quality, the response to stress, the antioxidant defense system in cururu stingray (*P. wallacei*) liver, and how a recovery process could affect them. Furthermore, it also examined the effects of EOLA on these transport-induced changes.

2. Materials and methods

2.1. Extraction of the *L. alba* essential oil

Lippia alba was cultivated at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brazil. The essential oil was obtained from its fresh leaves through hydrodistillation for 3 h using a Clevenger type apparatus as recommended by the literature (European Pharmacopoeia, 2007).

2.2. Animals

Specimens of cururu stingray, *P. wallacei* ($n = 35$, weight = 145 ± 44 g, disc width = 14.2 ± 1.1 cm, mean \pm standard deviation) were captured by professional fishermen in areas of flooded forest near to the Comunidade do Daraquá, in the Mariuá Arquipélago (Barcelos, Amazonas, Brazil). After captured, they were immediately placed in holding boxes (a single cururu stingray each), and later transferred to 6 net tanks (1 m^3) at a load density of 0.9 g/L (5 to 6 animals, each tank). Then, the cururu stingray were transported to the city of Barcelos. Once there, they were transferred to 14 plastic boxes (10L) at a load density of 36 g/L (from 2 to 3 animals, each tank) containing fresh and oxygenated water from the Rio Negro to be transported by boat for around 24 h to Manaus. Finally, when in Manaus, the cururu stingray were taken to the Laboratório Experimental de Fisiologia e Comportamento de Animais Aquáticos, at the Universidade Federal do Amazonas (UFAM), where they were kept in continuously aerated 6 tanks (400 L) at a load density of 2.2 g/L (5 to 6 animals, each tank, for 10–15 days for acclimation. This acclimation interval is suitable for the stingray recovery since it is accordance with the routine protocol used by the exporters in Manaus, which regularly ship these animals to the international ornamental fish. Furthermore, previously, a similar acclimation interval was used to acclimate other elasmobranch species before being submitted to a stress-related procedure (Ruiz-Jarabo et al., 2019). Water quality was

monitored during this period. The animals were fed twice a day (morning and afternoon) with fish pieces, worms, and crustaceans during this period. After feeding, the remaining food and feces were siphoned out. The Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade authorized this study (SISBIO #18285-1), which was conducted in accordance with the guidelines of the Comitê de Ética em Experimentação Animal of the UFAM (CEUA/UFAM # 002/2017).

2.3. Experimental transport protocol

The experimental transport protocol simulates the real conditions of a commercial transport of the cururu stingray to international market. Real conditions mean that these steps represent the routine procedures involving the transportation of ornamental fish species from the exporters to international dealers (importers) in USA and other countries. The previous steps, which were described in the item above, are only desired to make these animals accessible to put them in the market, and, in our case, to run the transport experiment. Therefore, for this purpose, after the recovery period, a set of cururu stingray ($n = 5$) from different tanks was sampled 5 days before starting the transport protocol to compose the "before transport" (BT) group. On the transport day, the remaining individuals ($n = 30$) were weighed and randomly distributed in 9 closed plastic bags containing water (9 L), which were inflated with pure oxygen at high pressure, at a load density of 50 g/L (from 3 to 4 specimens, each bag). The cururu stingray were transported inside these bags in the absence ($n = 15$) or presence of EOLA at 10 $\mu\text{L/L}$ ($n = 15$) (Azambuja et al., 2011; Salbego et al., 2017; Sena et al., 2016), which were placed into standardized Styrofoam boxes for transport. Then, the bags were air-shipped from the Eduardo Gomes International Airport (Manaus, Amazonas, Brazil) to the Salgado Filho International Airport (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil), where they subsequently were transported by road to the UFSM (Santa Maria). The total transport duration was approximately 32 h. When at the UFSM, the animals were taken to the Laboratório de Fisiologia de Peixes, where all boxes were opened to record mortality. After it, a set of cururu stingray ($n = 5$) transported in the absence of EOLA and other in its presence ($n = 5$) were immediately sampled to compose the "arrival without EOLA" and "arrival with EOLA" groups. The remaining individuals transported in the absence of this essential oil ($n = 10$) and other in its presence ($n = 10$) were immediately transferred to 20 continuously aerated tanks (40 L, initial pH 5.5, and dissolved oxygen (DO) levels always above 5.5 mg/L) – only one individual per tank – where they were maintained for 24 h and 48 h to assess its recovery from the trip, thus composing the following groups ($n = 5$, each group): 24 h post-transport (PT) without EOLA, 24 h PT with EOLA, 48 h PT without EOLA, 48 h PT with EOLA. It is essential to highlight that water samples were collected in sterile plastic tubes during all steps and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ for monitoring its quality. At the end of each experimental stage, the cururu stingray were weighed, anesthetized with 0.2 g/L eugenol (Oliveira et al., 2012) for blood collection by branchial vessel puncture using an insulin-type syringe coated with 10% EDTA, and then euthanized by rupture of the neural cord for liver removal. Blood samples were processed immediately, whereas liver samples were kept in sterile plastic tubes, frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for further analysis.

2.4. Water quality

pH was assessed through an AT-315 pH-meter (Alphakit, Florianópolis, Brazil) while the DO and temperature were measured using a Y5512 oxygen meter (YSI, Yellow Springs, USA). Results are expressed as mg/L and $^\circ\text{C}$, respectively. Finally, total ammonia levels were detected using a commercial kit (Labcom, Camboriú, Brazil). Results are expressed as mg/L.

2.5. Plasma

Blood was transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 2000g for 10 min at room temperature to separate plasma for determining glucose, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST).

2.6. Tissue homogenates

Liver homogenates were prepared according to Giustarini et al. (2013) for measuring total glutathione, and as Da Rosa et al. (2019) for quantifying ascorbic acid (AA), total antioxidant capacity (TAC), cysteine, the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase (GCLc), glutathione-related enzymes, and lipid peroxidation levels.

2.7. Assays

2.7.1. Glucose and aminotransferases

Glucose levels, ALT, and AST activities were assessed using commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Results are expressed as mg/dL and U/L, respectively.

2.7.2. Non-enzymatic antioxidants

Total glutathione levels were detected according to (Giustarini et al., 2013). AA levels were measured as (Roe and Kuether, 1943). TAC was quantified according to (Campos and Lissi, 1997). Results are expressed as $\mu\text{mol/g}$ tissue.

2.7.3. Glutathione synthesis

Cysteine levels were measured as Gaitonde (1967). Results are expressed as $\mu\text{mol/g}$ tissue. GCLc levels were detected through Western blotting assay. For this purpose, proteins were quantified using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). After it, proteins (30 μg) were separated through electrophoresis using 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. They were then transferred to nitrocellulose membranes through a TE77 Semi-Dry Transfer Unit (GE Healthcare, Chicago, USA). The non-specific protein-binding sites were blocked through membrane incubation with 5% bovine serum albumin for 1 h under agitation at room temperature. The membrane was then prepared for immunodetection using anti-GCLc (Abcam, Cambridge, UK). Bands were revealed through chemiluminescence utilizing Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (BioRad, Hercules, USA) using a ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad, Hercules, USA). Ponceau S staining was applied to normalize the results from each membrane.

2.7.4. Glutathione-related enzymes

Glutathione S-transferase (GST) activity was measured according to Habig et al. (1974). Results are expressed as nmol/min/g tissue. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH) activity was detected as Glock and McLean (1953). Results are expressed as $\mu\text{mol/min/g}$ tissue.

2.7.5. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed using two techniques, lipid hydroperoxides (LOOH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to Hermes-Lima et al. (1995), to detect its initial and final products, respectively. Results are expressed as nmol/g tissue and $\mu\text{mol/g}$ tissue, respectively.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software Statistica™ (Statsoft, Tulsa, USA). Levene's test was used to evaluate data homogeneity. The data were compared through two-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test. Results are reported as mean \pm standard error and the differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Water quality

Water pH levels at arrival were higher in the group without EOLA and lower in the EOLA group when compared to the BT group ($p < 0.05$). The DO levels were lower in the EOLA group than in the group without EOLA at arrival ($p < 0.05$). The water temperature was lower at arrival in both experimental groups when compared to BT ($p < 0.05$). Finally, total ammonia levels were higher at arrival in the group without EOLA compared to the BT group ($p < 0.05$) and the group with EOLA ($p < 0.05$) (Table 1).

3.2. Glucose

Plasma glucose levels were higher at arrival in the group without EOLA than in the BT ($p < 0.05$) and with EOLA at arrival groups ($p < 0.05$). Twenty-four hours after arrival plasma glucose levels from the group without EOLA returned to basal values (Fig. 1).

3.3. Non-enzymatic antioxidants

Total glutathione levels were lower in the cururu stingray liver in the groups without EOLA at arrival and 24H PT than in the BT group ($p < 0.05$). These levels were increased at 24H PT with EOLA and 48H without EOLA groups compared to the BT group ($p < 0.05$). All groups with EOLA (arrival, 24H PT and 48H PT) as well as the group without EOLA 48H PT showed higher total glutathione levels than the arrival without EOLA group ($p < 0.05$). These levels were also increased at 24H PT with EOLA group compared to the arrival with EOLA ($p < 0.05$) and 24H PT without EOLA groups ($p < 0.05$). 48H PT without EOLA group displayed higher total glutathione levels than the 24H PT without EOLA ($p < 0.05$), and 48H PT with EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 2A). Furthermore, AA levels were increased in 48H PT with EOLA group compared to BT ($p < 0.05$), arrival and 24H PT with EOLA ($p < 0.05$), and 48H PT without EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 2B). Regarding TAC, its levels were lower in arrival without EOLA group than in the BT group ($p < 0.05$). These levels were increased in 48H PT without EOLA group compared to the arrival without EOLA group ($p < 0.05$) (Fig. 2C).

3.4. Glutathione synthesis

Cysteine levels were higher in the cururu stingray liver in all groups with EOLA (arrival, 24H PT and 48H PT) as well as the groups without EOLA 24H PT and 48H PT than in the BT ($p < 0.05$) and arrival without EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 3A). Moreover, GCLc levels were decreased in all groups when compared to the BT group ($p < 0.05$). These levels were higher in all groups with EOLA (arrival, 24H PT and 48H PT) than in their respective groups without the EOLA ($p < 0.05$). They were also increased at 48H PT with EOLA group compared to the arrival without

Table 1
Water quality before and after the transport of cururu stingray (*P. wallacii*) in the absence or presence of the EOLA.

	pH	DO (mg/L)	Temperature (°C)	Total ammonia (mg/L)
BT	5.72 \pm 0.03	7.66 \pm 0.01	26.5 \pm 0.04	0.003 \pm 0.001
Arrival without EOLA	6.03 \pm 0.04*	8.47 \pm 0.05	23.4 \pm 0.02*	1.729 \pm 0.047*
Arrival with EOLA	4.58 \pm 0.06*#	7.02 \pm 0.50#	24.2 \pm 0.08*#	0.021 \pm 0.006#

Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: * $p < 0.05$ versus BT, # $p < 0.05$ versus the respective group without EOLA. Abbreviations: BT, before transport; DO, dissolved oxygen; EOLA, essential oil of *L. alba*.

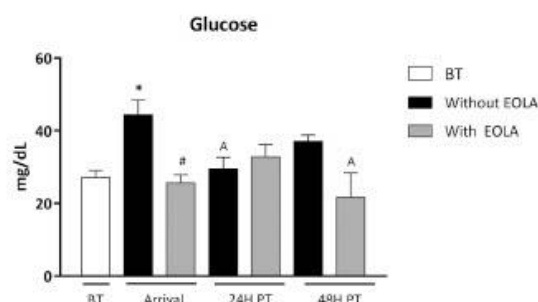


Fig. 1. Glucose levels in the plasma of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: * $p < 0.05$ versus BT, # $p < 0.05$ versus the respective group without EOLA, ^A $p < 0.05$ versus arrival without EOLA. Abbreviations: BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*.

($p < 0.05$) and with EOLA ($p < 0.05$), and 24H PT with EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 3B).

3.5. Glutathione-related enzymes

GST activity was higher in the cururu stingray liver in the group without EOLA at arrival than in the BT group ($p < 0.05$). This activity was increased at 48H PT with EOLA group when compared to the group without EOLA at arrival ($p < 0.05$) (Fig. 4). Furthermore, G6PDH activity was lower in all groups without EOLA (arrival, 24H PT and 48H PT) as well as the groups with EOLA at arrival and 24H PT than in the BT group ($p < 0.05$). This activity was increased at arrival with EOLA and 48H PT without EOLA groups when compared to the arrival without EOLA group ($p < 0.05$). GP6PDH activity was also higher at 24H PT with EOLA group than in the arrival with EOLA group ($p < 0.05$) and at 48H PT without EOLA group than in the 24H PT without EOLA group ($p < 0.05$). 48H PT with EOLA group displayed increased G6PDH activity when compared to 24H PT with EOLA ($p < 0.05$) and 48H PT without EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 4B).

3.6. Liver injury

Plasma ALT and AST activities were higher at arrival in the group without EOLA than in the BT group ($p < 0.05$). Moreover, both activities

were decreased all groups compared to the arrival without EOLA group ($p < 0.05$). The data are illustrated in Table 2. LOOH (Fig. 5A), and TBARS (Fig. 5B) levels were higher in the cururu stingray liver in the group without EOLA at arrival than in the BT group ($p < 0.05$). Moreover, LOOH were decreased in all groups compared to the arrival without EOLA group ($p < 0.05$) (Fig. 5A). TBARS levels, in turn, were higher in the 48H PT without EOLA group than in BT ($p < 0.05$) and 24H PT without EOLA groups ($p < 0.05$) (Fig. 5B). These levels were decreased in all groups with EOLA (arrival, 24H PT and 48H PT) as well as in the group with EOLA at 24H PT when compared to the arrival without EOLA group ($p < 0.05$) (Fig. 5B).

4. Discussion

Live fish transport is recognized as a major source of stress leading to poor welfare and mortality within the ornamental fish industry (Vanderzwalmen et al., 2019). Studies involving transport have pointed out that the most crucial water markers to manage are DO, temperature, pH, and ammonia (Becker et al., 2012; Boaventura et al., 2021; Brinn et al., 2012; Hohlenwerger et al., 2017; Refaey and Li, 2018; Saccol et al., 2018; Sena et al., 2016). However, it is unknown how tolerant cururu stingray would be to changes in these biomarkers. What it is known is that the cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*), a famous Amazonian ornamental fish abundant in the middle Rio Negro basin, Amazonas, Brazil, is tolerant to a wide range pH (from 2.9 to 8.8), high water temperature (33.3 °C), and high total ammonia levels (23.7 mg/L), but not to temperature below 19.6 °C, which could compromise its survival during long shipment abroad (de Oliveira et al., 2008).

Based on these data, it seems that all the water quality markers analyzed by the current research are within the tolerable levels by Amazonian species, not only after transport but also during recovery. Furthermore, it is worth mentioning that although no mortality was seen through this study, changes in these biomarkers, including higher pH, total ammonia, and lower temperature levels, were detected after transport. Among them, ammonia accumulation deserves more attention during water quality monitoring due to its toxic effects on fish (Gomes et al., 2009). Likewise, Brinn et al. (2012) reported that the transport of cururu stingray from Barcelos to Manaus, Amazonas, Brazil, during 24 h also occasioned changes in water quality, including the increase in the pH (from 4.1 to 6.6) and total ammonia levels (about 3 mg/L), due to high ammonia excretion rate from this fish species, culminating in stress reflected by high corticosterone levels in its blood according to boat transport duration.

Diverse studies have shown that the increase in plasma glucose levels is a good stress indicator during transport, being a common feature for

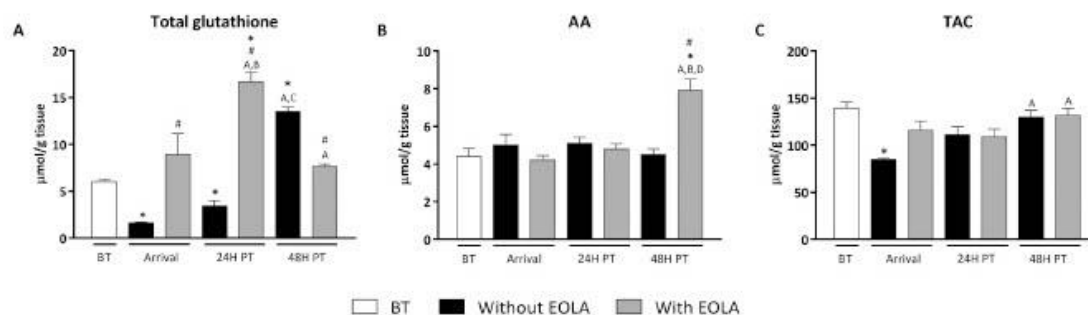


Fig. 2. Total glutathione (A), AA (B), and TAC levels (C) in the liver of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: * $p < 0.05$ versus BT, # $p < 0.05$ versus the respective group without EOLA, ^A $p < 0.05$ versus arrival without EOLA, ^B $p < 0.05$ versus arrival with EOLA, ^C $p < 0.05$ versus 24H PT without EOLA, ^D $p < 0.05$ versus 24H PT with EOLA. Abbreviations: AA, ascorbic acid; BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*; PT, post-transport; TAC, total antioxidant capacity.

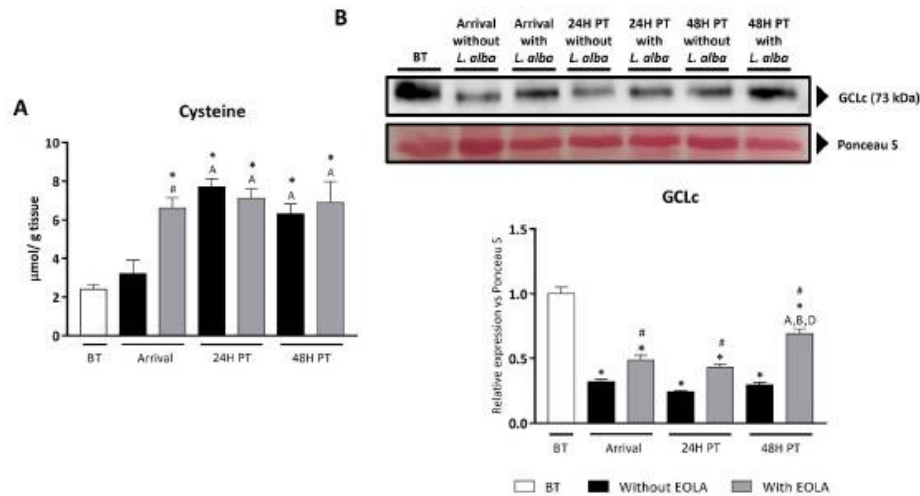


Fig. 3. Cysteine (A), and GCLc levels (B) in the liver of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: * $p < 0.05$ versus BT, # $p < 0.05$ versus the respective group without EOLA, ^A $p < 0.05$ versus arrival without EOLA, ^B $p < 0.05$ versus arrival with EOLA, ^D $p < 0.05$ versus 24H PT with EOLA. Abbreviations: BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*; GCLc, catalytic subunit of glutamate cysteine ligase; PT, post-transport.

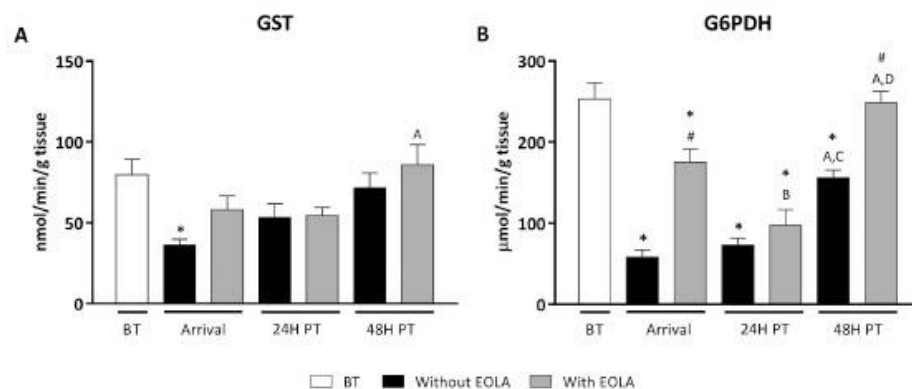


Fig. 4. GST (A) and G6PDH activities (B) in the liver of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery. Results are expressed as mean \pm standard error. The statistical difference is indicated as follows: * $p < 0.05$ versus BT, # $p < 0.05$ versus the respective group without EOLA, ^A $p < 0.05$ versus arrival without EOLA, ^B $p < 0.05$ versus 24H PT without EOLA, ^C $p < 0.05$ versus 24H PT without EOLA, ^D $p < 0.05$ versus 24H PT with EOLA. Abbreviations: BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione S-transferase; PT, post-transport.

teleost fish (Boaventura et al., 2021; Refaey and Li, 2018; Saccol et al., 2018). However, as a previous investigation, cururu stingray did not trigger a typical teleost hyperglycemic reaction to stress, being corticosterone recognized as a more reliable alternative of stress indicator for this elasmobranch species (Brinn et al., 2012); although it is known that 1- α hydroxycorticosterone is the main stress-related corticosteroid hormone found in elasmobranch (Anderson, 2012). Recently, Ruiz-Jarabo et al. (2019) revealed, for the first time, the glucocorticoid action of 1- α hydroxycorticosterone in elasmobranchs, identifying that, in response to an acute challenging situation, this hormone is responsible for increasing glycolysis and gluconeogenesis pathways to fuel glucose levels in energy-demanding tissues of catshark (*Scyliorhinus canicula*), as white muscle, liver, and plasma. Although the current research did not evaluate the 1- α hydroxycorticosterone or corticosterone levels, it was

observed that plasma glucose levels are about 1.6-fold higher after a long-time transport, returning to their basal levels after 24 h recovery. Thus, it seems that hyperglycemia could also be considered other alternative marker for stress during transport in cururu stingray when 1- α hydroxycorticosterone measurement is not available.

To the best of our knowledge, this is the first report showing part of the antioxidant defense system of cururu stingray. Also, for the first time, this study revealed that the transport of this species for approximately 32 h impairs the antioxidant response in its liver, thus, causing injury, being essentially an adaptive process that could take more than 48 h for its total recovery. The liver was chosen as a target of this investigation because previous studies have shown that its antioxidant response is affected in different fish species during transport (Azambuja et al., 2011; Boaventura et al., 2021; Du et al., 2016). Moreover, it is

Table 2
Aminotransferases activities in the plasma of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery.

	ALT (U/L)	AST (U/L)
BT	5.8 ± 2.10	19.0 ± 6.68
Arrival without EOLA	20.3 ± 3.88 [*]	55.5 ± 9.01 [*]
Arrival with EOLA	10.4 ± 1.71 [#]	37.3 ± 5.71 [#]
24H PT without EOLA	6.6 ± 1.43 ^A	24.3 ± 5.62 ^A
24H PT with EOLA	2.8 ± 0.74 ^A	24.3 ± 1.89 ^A
48H PT without EOLA	2.7 ± 0.56 ^A	21.5 ± 1.95 ^A
48H PT with EOLA	1.7 ± 0.23 ^A	30.3 ± 4.74 ^A

Results are expressed as mean ± standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^{*} p < 0.05 versus BT, [#] p < 0.05 versus the respective group without EOLA, ^A p < 0.05 versus arrival without EOLA. Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*; PT, post-transport.

known that freshwater stingray (*Potamotrygon* spp.) possesses a physiologically fatty liver (Oguri, 1985), which could be more susceptible to lipid peroxidation since several studies have reported that an excessive fat deposition in the fish liver can produce an inadequate antioxidant response (Li et al., 2020; Tao et al., 2018). Indeed, a previous investigation revealed that elasmobranchs and other fish species exhibit about 2-fold higher lipid peroxidation levels in their liver measured as malondialdehyde/TBARS than mammals (Wilhelm Filho and Boveris, 1993).

Antioxidants, including enzymes and different non-enzymatic vitamins as AA, and low-molecular weight thiols as reduced glutathione (GSH), are the most important non-enzymatic endogenous defense systems in fish, including elasmobranchs (López-Cruz et al., 2012). Elasmobranchs possess higher GSH levels in the blood than teleosts (Rudneva, 1997); nevertheless, the impact of the long-term transport on these levels in the fish liver is still unknown. The glutathione antioxidant system is controlled by a transcription factor called nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), which plays an essential role in cell redox homeostasis (Tonelli et al., 2018). It has been described that Nrf2 deletion provoked marked oxidative stress and fibrosis in the mice liver (Duarte et al., 2017; Sugimoto et al., 2010). This pathway is also characterized in teleost fish, most notably in zebrafish (*Danio rerio*) (Kobayashi et al., 2002; Mukaigasa et al., 2012), and, more recently, in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Ramsden and Gallagher, 2016).

It is widely recognized that Nrf2 tightly regulates GSH levels by directly controlling GCLC, which catalyzes glutamate reaction with

cysteine, the rate-limiting step in the GSH synthesis (Wild et al., 1999). Thus, the current investigation, through evaluating this Nrf2 target, supports the first evidence that transport triggers total glutathione depletion in the stingray liver due to an impairment in its synthesis, since although it did not promote any change in cysteine levels, it affected GCLC expression, diminishing it, as shown by Western Blot analysis. Furthermore, total glutathione depletion seems to be responsible for decreasing TAC amounts since this method estimates total non-enzymatic antioxidants' potential to counteract oxidative stress-induced cell injury (Apak et al., 2016), and AA levels were unchanged in the stingray liver after transport. However, it is still unclear whether this stressful situation could influence glutathione redox status; thus, it would be an interesting point to explore in future work.

Besides GSH synthesis, Nrf2 also regulates the transcription of numerous ROS- and xenobiotic-detoxifying enzymes, including several GSTs (Chanas et al., 2002). These enzymes use GSH, thus generating oxidized glutathione, which is, in turn, reduced back to GSH by glutathione reductase, another Nrf2 target, in an NADPH-dependent manner (Harvey et al., 2009). Likewise, NADPH production is also supported by Nrf2 via G6PDH upregulation (Wu et al., 2011). Our group's previous research showed that the transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*), a freshwater teleost, diminished the GST activity in its liver in a time-dependent manner, being affected especially after longer transport periods (7 h) (Azambuja et al., 2011). Moreover, it was reported that a different challenging situation, the air exposure, inhibited the G6PDH activity in the catfish liver (Ruiz-Jarabo et al., 2019).

This study exhibited that cururu stingray transport leads to a decline in the activity of both glutathione-related enzymes, GST and G6PDH, attributing such changes perhaps to the oxidative stress-induced Nrf2 deficiency, since initial and final lipid peroxidation products were found at least 2.5-fold higher after it, leading to a liver injury, also seen through the activities of aminotransferases. Accordingly, Du et al. (2016) showed that the transport of tapertail anchovy (*Coilia nasus*), a marine anadromous teleost, for at least 4 h induced lipid peroxidation and changes in the first line of enzymatic antioxidant defense in its liver, like superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPx), being the last one also an Nrf2 target. Likewise, Boaventura et al. (2021) evidenced that the pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) transport for 4 h promoted liver lipid peroxidation and SOD deficiency. It was linked to low water quality, characterized mainly by high total ammonia levels (approximately 3.5 mg/L). Regarding ammonia toxicity, it was shown that the exposure of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) to total ammonia at 5.7 mg/L triggered liver oxidative stress, being high total

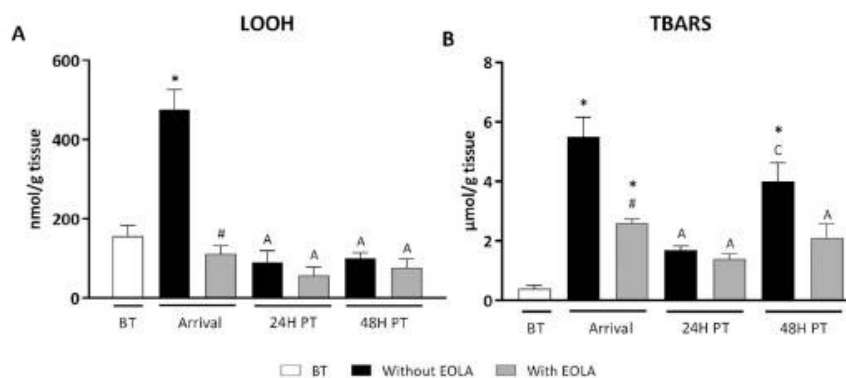


Fig. 5. LOOH (A) and TBARS levels (B) in the liver of cururu stingray (*P. wallacei*) before and after its transport in the absence or presence of the EOLA: the properties of the post-transport recovery. Results are expressed as mean ± standard error. The statistical difference is indicated as follows: ^{*} p < 0.05 versus BT, [#] p < 0.05 versus the respective group without EOLA, ^A p < 0.05 versus arrival without EOLA, ^C p < 0.05 versus 24H PT without EOLA. Abbreviations: BT, before transport; EOLA, essential oil of *L. alba*; LOOH, lipid hydroperoxides; PT, post-transport; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

ammonia levels detected in this organ after 3 h, reaching its peak at 12 h (Li et al., 2016). Additionally, Yu et al. (2020) reported that *Rhynchocypris lagowski*, another teleost species, challenged with ammonia at 6.0 mg/L exhibited high *nuclear factor kappa B (Nfkb)* and low *Nrf2* levels associated with a diminished expression of their target genes involved in the antioxidant response, including, *hemoxygenase-1*, *Gpx1*, and *Gclc*. Hence, it looks like that, in this study, total ammonia could also be the main factor responsible for transport-induced oxidative stress in the cururu stingray liver.

Next, the current investigation chose to evaluate whether recovery for up to 48 h should be sufficient to improve the antioxidant responses in the cururu stingray liver, and it seems that more than a 48 h adaptive process is required to reestablish all of them to the basal levels, especially for GCLc and G6PDH. Maltez et al. (2017) reported that the exposure of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) to 0.57 mg/L NH₃-N (ammonia concentration as nitrogen) for 10 days triggered lipid peroxidation in its liver, and a 10 day-recovery in ammonia-free water was not enough to restore it. Furthermore, it is worth mentioning that, although in the present research, the total glutathione levels were markedly increased after 48 h recovery, it could represent a rise in the amounts of its oxidized form since this measure corresponds to the quantification of its total levels, including oxidized and reduced glutathione. This assumption is based on the fact that the two Nrf2 targets involved in GSH synthesis and regeneration, GCLc and G6PDH, respectively, did not recover their optimal functions after 48 h recovery, culminating, then, in the formation of lipid peroxidation products. Future works will be fundamental to address this point.

Brimm et al. (2012), when searching for compounds that could reduce stress during cururu stingray transport, have indicated that probiotics and antibiotics should be avoided in this situation since they did not prevent the increase in plasma corticosterone and also the osmoregulatory disturbances. Essential oils stand out in this context since they are considered good stress-reducing agents for fish aquaculture procedures as transport (de Souza et al., 2019). Among them is the EOLA. This essential oil has been extensively studied in the last decade, showing beneficial effects during transport by preventing the degradation of water quality (Becker et al., 2012; Hohlenwerger et al., 2017; Sena et al., 2016), stress (Hohlenwerger et al., 2017; Sena et al., 2016), osmoregulatory disturbances (Becker et al., 2012), and also improving the liver antioxidant response in teleost fish (Azambuja et al., 2011; Salbego et al., 2017). However, its properties on the elasmobranchs are unknown at all. Thus, the current research is the first evidence exhibiting that the addition of the EOLA during the transport improves the water quality, prevents the stress, and avoids most changes in the antioxidant system in the cururu stingray liver at its arrival, and, especially, after 48 h recovery, thus speeding up the recovery process that could take more than 48 h when the transport is carried out in the absence of this additive. It is essential to highlight that the cururu stingray antioxidant system recovered its optimal liver function only after 48 h recovery when transport was completed in the presence of EOLA.

First of all, the EOLA concentration used in this study (10 µL/L) is widely recognized for inducing slight sedation in fish during transport (Azambuja et al., 2011; Becker et al., 2012; Sena et al., 2016), which is highly desirable to prevent or reduce stress in this condition (de Souza et al., 2019). As stated by Becker et al. (2012), the EOLA, at this concentration, apparently can decrease the metabolic rate in teleost fish because it reduced the ventilatory frequency, net ion loss, and total ammonia excretion after 4 h-transport. Moreover, it was shown that the EOLA at 10 µL/L enhanced not only the water quality during 8 h-transport by decreasing total and non-ionized ammonia levels (Hohlenwerger et al., 2017; Sena et al., 2016), but also the stress response through diminishing the cortisol levels in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) plasma (Sena et al., 2016). Accordingly, the current investigation displayed that the EOLA contributes to water quality maintenance during transport of cururu stingray by decreasing total ammonia levels at the arrival, where its values

are found 4.8-fold lower. Besides, by improving water quality, the EOLA reduces the stress during transport, as can be seen through the glucose levels in the cururu stingray plasma, which were returned to the basal amounts at the arrival and 48 h post-transport. Hohlenwerger et al. (2017), on the other hand, achieved the same protective response against the transport-induced stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) only using the EOLA at higher concentration (20 µL/L), indicating a species-specific response. Further studies would also be essential to elucidate how the EOLA could impact the glucose levels in cururu stingray plasma; thus, determining plasma 1-α hydroxycorticosterone levels, glycolysis, and gluconeogenesis pathways in muscle, liver, and plasma, would be a good start.

Furthermore, the addition of EOLA with the linalool chemotype, at 10 µL/L, to water during transport has been considered useful for activating the first line of enzymatic antioxidant defense, including SOD and catalase (Azambuja et al., 2011), and also increasing total glutathione levels (Salbego et al., 2017), and the activity of a known GSH-related enzyme, the GST (Azambuja et al., 2011; Salbego et al., 2017), thus, reducing the lipid peroxidation levels in the silver catfish liver (Azambuja et al., 2011; Salbego et al., 2017). Indeed, linalool has been considered a hepatoprotective compound since it defended mice against the liver injury in a dose-dependent manner by inducing the antioxidant system via Nrf2 activation and reducing inflammatory response via NF-κB inhibition (Li et al., 2014). The current investigation reported that when the transport was carried out in the presence of the EOLA, it perhaps has triggered Nrf2 activation in the cururu stingray liver at its arrival, thus, reducing lipid peroxidation by stimulating the GSH-dependent antioxidant response not only through increasing cysteine levels and, consequently, total glutathione synthesis via GCLc up-regulation, but also by maintaining glutathione in its reduced state via G6PDH induction. Additionally, the antioxidant response pattern seen for the cururu stingray liver at its arrival in the presence of EOLA is similar to that detected after 48 h recovery, where the fish transported with this essential oil exhibited optimal values for all antioxidant evaluated in their liver, including GST activity, AA levels, and TAC amounts. Recently, Wu et al. (2020) have pointed out the important role of AA during simulated transport in reducing the stress response, improving the innate immune activity, and ensuring the higher survival rate to the tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). Different from the teleost fish, the elasmobranchs, including the Amazonian freshwater stingray, *Potamotrygon* sp. (Fracalossi and Allen, 2001), and the freshwater Asian white-rimmed stingray, *Himantura signifer* (Wong et al., 2013), synthesize AA from the glucose in the renal tissue. Thus, it seems that the EOLA could help to mobilize at least a part of the AA to the liver, thus contributing to the overall recovery of this tissue from the damage.

Therefore, it can be concluded that the addition of EOLA to the transport water at 10 µL/L is highly advisable when transporting cururu stingray for more than 30 h since it reduces total ammonia levels, improving water quality; decreases its hyperglycemic response, preventing stress; and, finally, reestablishes most changes in the GSH-related antioxidant system in its liver, avoiding enhanced (or further) lipid peroxidation at its arrival and, mostly, after 48 h recovery, thus speeding up the recovery process that could take more than 48 h in the absence of this additive.

Author statement

Karine Ariotti: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing-Original draft preparation, Visualization. Jaydione L. Marcon: Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing-Reviewing and Editing, Visualization, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition. Isabela A. Finamor: Conceptualization, Validation, Investigation, Formal analysis, Writing-Original draft preparation, Visualization, Supervision. Caroline A. Bressan: Investigation, Formal analysis, Writing-Reviewing and Editing, Visualization. Cristiano L. de Lima: Investigation and Writing-Reviewing

and Editing. Carine de F. Souza: Investigation, Writing-Reviewing and Editing. Bráulio O. Caron: Resources, Writing-Reviewing and Editing. Berta M. Heinzmann: Resources, Writing-Reviewing and Editing. Bernardo Baldissarroto: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing-Reviewing and Editing, Visualization, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition. Maria A. Pavanato: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources, Writing-Reviewing and Editing, Visualization, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq, Brazil), processes #484566/2013-0 to JLM, and #431523/2016-9 to MAP. The authors are grateful to the Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarships. They also would like to thank the Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep), UFSM, Santa Maria, Brazil, for kindly allowing them to use the ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad, Hercules, USA).

References

- Anderson, W.G., 2012. The endocrinology of 1 α -hydroxycorticosterone in elasmobranch fish: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.08.015>.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* 64, 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
- Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., de Garcia, L.O., Hekdwain, C. G., Heinzmann, B.M., Baldissarroto, B., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>.
- Becker, A.G., Parodi, T.V., Hekdwain, C.G., Zeppenfeld, C.C., Heinzmann, B.M., Baldissarroto, B., 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 789–796. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4>.
- Boaventura, T.P., Souza, C.F., Ferreira, A.L., Paveiro, G.C., Baldissarroto, B.M., Heinzmann, B.M., Baldissarroto, B., Luz, R.K., 2021. The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil during the transport of *Lepomis microlophus* water quality, hematology, blood biochemistry and oxidative stress. *Aquaculture* 531, 735964. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735964>.
- Brina, R.P., Marcon, J.L., McComb, D.M., Gomes, L.C., Abreu, J.S., Baldissarroto, B., 2012. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. histrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.004>.
- Campos, A.M., Lissi, E.A., 1997. Kinetics of the reaction between 2,2'-azino bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *Int. J. Chem. Kinet.* 29, 219–224.
- Carvalho, M.R.D., Rosa, R.S., Araújo, M.L.G.D., 2016. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon. *Zootaxa* 4107, 566–586. [DOI:10.11646/zootaxa.4107.4.5](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4107.4.5).
- Chanat, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, G.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2002. Loss of the Nr2f transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* 365, 405–416. <https://doi.org/10.1042/BJ20020320>.
- Chao, N., 2001. Fisheries, diversity and conservation of ornamental fish of the Rio Negro River, Brazil - a review of project Piaba (1989-99). Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba 161–204.
- Da Rosa, V.M., Ariotti, K., Bressan, C.A., da Silva, E.G., Dallaporta, M., Júnior, G.B., da Costa, S.T., de Vargas, A.C., Baldissarroto, B., Finamor, I.A., Pavanato, M.A., 2019. Dietary addition of rutin impairs inflammatory response and protects muscle of silver catfish (*Rhamdia quelen*) from apoptosis and oxidative stress in *Aeromonas hydrophila*-induced infection. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 226, 108611. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108611>.
- de Oliveira, S.R., de Souza, R.T.Y.B., Nunes, E., Da, S.S., de Carvalho, C.S.M., de Menezes, G.C., Marcon, J.L., Roubach, R., Ono, E.A., Afonso, E.G., 2008. Tolerance to temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an Amazonian ornamental fish. *Acta Amaz.* 38, 773–779. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400023>.
- de Souza, C.F., Baldissarroto, B.M., Heinzmann, B.M., Martos-Sitka, J.A., Mancera, J.M., 2019. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>.
- Du, F., Xu, G., Gao, J., Nie, Z., Xu, P., Gu, R., 2016. Transport-induced changes in hypothalamic-pituitary-interrenal axis gene expression and oxidative stress responses in *Coilia nasus*. *Aquac. Res.* 47, 3599–3607. <https://doi.org/10.1111/are.12812>.
- Duarte, T.L., Calkas, C., Santos, A.G., Silva-Gomes, S., Santos-Gonçalves, A., Martins, M. J., Porto, G., Lopes, J.M., 2017. Genetic disruption of NRF2 promotes the development of necroinflammation and liver fibrosis in a mouse model of HFE-hereditary hemochromatosis. *Redox Biol.* 11, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.013>.
- Pracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, Lúcia, K., Ofstedal, O.T., 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture* 192, 321–332. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00455-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00455-5).
- Gaitonde, M.K., 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* 104, 627–633.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Panti, P., Rossi, R., 2013. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat. Protoc.* 8, 1660–1669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095>.
- Glock, G.E., McLean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55, 400–406. <https://doi.org/10.1042/bj0550400>.
- Gomes, L.C., Brinn, R.P., Marcon, J.L., Dantas, L.A., Brandão, F.R., Abreu, J.S.D., Lemos, P.E.M., McComb, D.M., Baldissarroto, B., 2009. Benefits of using the probiotic Efnoc®L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. *Aquac. Res.* 40, 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02077.x>.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Harvey, C.J., Thimmulappa, R.K., Singh, A., Blake, D.J., Ling, G., Wakabayashi, N., Fujii, J., Myers, A., Biswal, S., 2009. Nr2f-regulated glutathione recycling independent of biotransformation is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-x](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-x).
- Hohlenwenger, J.C., Baldissarroto, B., Couto, R.D., Heinzmann, B.M., da Silva, D.T., Caron, B.O., Schmidt, D., Copatti, C.E., Hohlenwenger, J.C., 2017. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. *Cienc. Rural* 47. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160040>.
- Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y., Yamamoto, M., 2002. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nr2f-Keap1 system. *Genes Cells* 7, 807–820. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00561.x>.
- Li, J., Zhang, X., Huang, H., 2014. Protective effect of linoleol against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *Immunopharmacol.* 23, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.10.001>.
- Li, M., Gong, S., Li, Q., Yuan, L., Meng, F., Wang, R., 2016. Ammonia toxicity induces glutamine accumulation, oxidative stress and immunosuppression in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvipes*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 183–184, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.01.005>.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, N., Chen, J., Guo, L., Dai, Z., Wang, C., Wu, Z., Wu, G., 2020. Dietary L-arginine supplementation reduces lipid accretion by regulating fatty acid metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00486-7>.
- Lim, L.C., Dhert, P., Sorgeloos, P., 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquac. Res.* 34, 923–935. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00946.x>.
- López-Cruz, R.I., Dafre, A.L., Filho, D.W., 2012. Oxidative Stress in Sharks and Rays, in: *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 157–164. <https://doi.org/10.1002/9781144434598.ch11>.
- Maltz, L.C., Stringhetta, G.R., Enamorado, A.D., Okamoto, M.H., Romano, L.A., Monserrat, J.M., Sampaio, L.A., Garcia, L., 2017. Ammonia exposure and subsequent recovery trigger oxidative stress responses in juveniles of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 1747–1759. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0406-8>.
- Monticini, P., 2010. The ornamental fish trade. In: *Production and Commerce of Ornamental Fish: Technical-Managerial and Legislative Aspects*. GLOBEFISH Research Programme (FAO).
- Mukaigawa, K., Nguyen, L.T.P., Li, L., Nakajima, H., Yamamoto, M., Kobayashi, M., 2012. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nr2f in the protection against oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4455–4461. <https://doi.org/10.1128/MCB.00481-12>.

- OEC, 2018. Ornamental Fish, Live (HS: 090110): Product Trade, Exporters and Importers [WWW Document]. Observatory Economic Complexity. <https://oec.world/en/profile/hu92/ornamental-fish-live?redirect=true> (accessed 2.16.21).
- Oguri, M., 1985. On the liver tissue of freshwater stingrays and balloonfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 51, 717–720. <https://doi.org/10.2331/suisan.51.717>.
- Oliveira, A.T., Lemos, J.R.G., Santos, M.Q.C., De Araújo, M.L.G., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L., 2012. Procedimentos de manuseio e de colheita do sangue em arraias de água doce, 1st ed. Embrapa, Macapá, Amapá, Brasil.
- Pharmacopoeia, European, 2007. European Pharmacopoeia. Council Of Europe, Strasbourg.
- Ramaden, R., Gallagher, E.P., 2016. Dual Nrf2 paralogs in Coho salmon and their antioxidant response element targets. *Redox Biol.* 9, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.07.001>.
- Refaey, M.M., Li, D., 2018. Transport stress changes blood biochemistry, antioxidant defense system, and hepatic HSPs mRNA expressions of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Front. Physiol.* 9 <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01628>.
- Roe, J.H., Kuether, C.A., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 147, 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72395-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72395-8).
- Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00111-4).
- Ruiz-Jarabo, I., Barragán-Méndez, C., Jerez-Cepa, I., Fernández-Castro, M., Sobrino, L., Mancera, J.M., Aerts, J., 2019. Plasma 1 α -hydroxycorticosterone as biomarker for acute stress in catsharks (*Scyliorhinus canicula*). *Front. Physiol.* 10 <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01217>.
- Saccol, E.M.H., Jerez-Cepa, I., Ourique, G.M., Pês, T.S., Gressler, L.T., Mourão, R.H.V., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., Baldissarotto, B., Pavanato, M.A., Martos-Sitche, J.A., 2018. *Myrcia zylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. *Res. Vet. Sci.* 117, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.009>.
- Salbejo, J., Toni, C., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Menezes, C.C., Loro, V.L., Heinzmann, B.M., Baldissarotto, B., 2017. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. *Braz. J. Biol.* 77, 696–702. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.16515>.
- Sena, A.C., Teixeira, R.R., Ferreira, E.L., Heinzmann, B.M., Baldissarotto, B., Caron, B.O., Schmidt, D., Couto, R.D., Copatti, C.E., 2016. Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus × *Colomesoma macropomum*). *Aquaculture* 465, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.033>.*
- Sugimoto, H., Okada, K., Shoda, J., Warabi, E., Ishige, K., Ueda, T., Taguchi, K., Yanagawa, T., Nakahara, A., Hyodo, I., Ishii, T., Yamamoto, M., 2010. Deletion of nuclear factor- κ B-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G283–G294. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00296.2009>.
- Tao, Y.-P., Qiang, J., Bao, J.-W., Chen, D.-J., Yin, G.-J., Xu, P., Zhu, H.-J., 2018. Changes in physiological parameters, lipid metabolism, and expression of microRNAs in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) with fatty liver induced by a high-fat diet. *Front. Physiol.* 9, 1521. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01521>.
- Tonelli, C., Chio, I.L.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
- Vanderzwalmen, M., Eaton, L., Mullen, C., Henriquez, F., Carey, P., Soellgrove, D., Sloman, K.A., 2019. The use of feed and water additives for live fish transport. *Rev. Aquac.* 11, 263–278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>.
- Wild, A.C., Moynova, H.R., Mukahy, R.T., 1999. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* 274, 33627–33636. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33627>.
- Wilhelm Filho, D., Boveris, A., 1993. Antioxidant defences in marine fish—II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 106, 415–418. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90155-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90155-E).
- Wong, S.Z.H., Ching, B., Chng, Y.R., Wong, W.P., Chew, S.F., Ip, Y.K., 2013. Ascorbic acid biosynthesis and brackish water acclimation in the euryhaline freshwater white-rimmed stingray, *Himantura signifer*. *PLoS One* 8, e66691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066691>.
- Wu, K.C., Cui, J.Y., Klaassen, C.D., 2011. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol. Sci.* 123, 590–600. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr183>.
- Wu, B., Wang, Q., Cao, J., Mei, J., Xie, J., 2020. Effects of ascorbic acid and β -1,3-glucan on survival, physiological response and flesh quality of cultured tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) during simulated transport in water. *Biology* 9, 37. <https://doi.org/10.3390/biology9020037>.
- Yu, Z., Quan, Y.-N., Huang, Z.-Q., Wang, H.-H., Wu, L.-F., 2020. Monitoring oxidative stress, immune response, Nrf2/NF- κ B signaling molecules of *Rhynchocypris lagowski* living in BFT system and exposed to waterborne ammonia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 205, 111161. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111161>.

4. CONCLUSÕES

A adição do óleo essencial de *Lippia alba* à água de transporte das arraias cururu (*Potamotrygon wallacei*), na proporção de 10 µL/L foi benéfica a espécie em transporte por mais de 30h. Os benefícios foram detectados tanto nos parâmetros de qualidade de água estudados, como no tecido de fígado onde foram feitas as análises dos parâmetros oxidativos. Na água de transporte houve a redução dos níveis totais de amônia, diminuindo o potencial ambiente estressor por sua grande quantidade. Já o efeito benéfico em tecido de fígado, foi detectado durante o período de recuperação das arraias pós transporte, onde a peroxidação lipídica foi diminuída e a resposta antioxidante foi positiva, como por exemplo a atividade de GST, os níveis de AA e os valores de TAC que foram reestabelecidas perto de níveis basais. Sendo assim, a adição do óleo essencial de *Lippia alba* a água de transporte é uma alternativa eficaz, de fácil manipulação e com grande rendimento tanto para pequenos pescadores ribeirinhos, como para grandes empresas transportadoras, pois agiliza o processo de recuperação da arraia cururu pós transporte que poderia durar mais de 48h, minimiza os danos causados pelas longas horas enfrentadas e principalmente reduz possíveis óbitos destes animais.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, B.; H.D.; AMORIM Dos.; SIQUEIRA, S.; R.M. De.; J.A. & ANJOS, C.R. Dos. (2009). Ornamental Fish Export Of The State Of Amazonas, Amazon Basin, Brazil. *Boletim Do Instituto De Pesca* 35, 259-274 Acesso em: 09 jun 2019
- ANTONENKOV, V. D. et al. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 13, n. 4, p. 525-537, July 2010. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2009.2996>>. Acesso em: 16 julho 2021. DOI: 10.1089/ars.2009.2996
- AZAMBUJA, C.R., et al., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319, 156–161. Acesso em: 5 de abril 2021
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>
- BIONDO, V. M. e BURKI, P.R. A Systematic Review of the Ornamental Fish Trade with Emphasis on Coral Reef Fishes—An Impossible Task. *Animals*, nov 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/11/2014> Acesso em 11 jan. 2021 DOI: 10.3390/ani10112014
- BOWER, C.E., TURNER, D.T., 1982. Ammonia removal by clinoptilolite in the transport of ornamental freshwater fishes. *Progressive Fish-Culturist* 44, 19–23. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1982\)44\[19,ARBCIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1982)44[19,ARBCIT]2.0.CO;2). Acesso em: 05 JAN. 2021
- BRINN, R.P., MARCON, J.L., McCOMB, D.M., GOMES, L.C., ABREU, J.S., BALDISSEROTTO, B., 2012. Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. histrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162, 139–145. Acesso em: 20 maio 2019 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.004>
- CARVALHO, M.R.D., ROSA, R.S., ARAÚJO, M.L.G.D., 2016. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of Potamotrygon. *Zootaxa* 4107, 566–586. Doi:10.11646/zootaxa.4107.4.5. Acesso em: 02 maio 2021
- CARVALHO, M. R.; LOVEJOY, N. R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Zootaxa*, v. 2776, p. 13-48, 2011. Acesso em: 06 jun 2021
- CHAMPMAN, F. A. (2000). Ornamental fish culture, freshwater. *Encyclopedia of aquaculture*, 3: 602-610. Acesso em: 19 maio 2021
- CHANAS, S.A., JIANG, Q., McMAHON, M., McWALTER, G.K., McLELLAN, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2,

Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 365, 405–416. Acesso em: 02 maio 2021 <https://doi.org/10.1042/BJ20020320>

CHAO, N., 2001. Fisheries, diversity and conservation of ornamental fish of the Rio Negro River, Brazil- a review of Project Piaba (1989-99). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba* 161–204.

COELHO, M. G. (2009). Óleos essenciais para aromaterapia. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-emprededorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais, Universidade do Minho.

DEY, V.K. THE GLOBAL TRADE IN ORNAMENTAL FISH . *INFOFISH International* 4/2016 • www.infofish.org 52-55. Acesso em: 17 jun 2020

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*, v. 80 (suppl 1), p. S77-112, Aug, 1998. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/functional-food-science-and-defence-against-reactive-oxidative-species/D63DEA9DF99A59E3394F233F15F09418>>. Acesso em: 26 jul. 2019. DOI: 10.1079/BJN19980106.

DUNCAN, W.P., INOMATA, S.O., FERNANDES, M.N., 2010. Comercio de raias de agua doce na regio do medio Rio Negro, estado do Amazonas, Brasil. *Rev. Bras. Eng. Pesc.* 5, 13e22.

DUNCAN, W.L.P., 2016. Ecofisiologia das raias de agua doce (Potamotrygonidae): mecanismos de interação organismo ambiente. In: C.A. Lasso, R.S. Rosa, M.A. Morales Betancourt, D. Garrone-Neto & M.R. Carvalho, eds. XV. Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramerica. Parte II: Colombia, Brasil, Peru, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Bogota, Colombia: Serie Editorial Recursos Hidrobiologicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigacion de Recursos Biologicos Alexander von Humboldt (IAvH), 45–66.

FERREIRA, V.A. et al. Avaliação do comércio de peixes ornamentais no estado do Amazonas – Brasil. *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, março 2020. Disponível em: <<https://www.eumed.net/rev/oel/2020/03/avaliacao-comercio-peixes.html>> Acesso em 17 fev. 2022.

FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1822, n. 9, p. 1363-1373, Sept. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911002791>>. Acesso em: 21 abr. 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.12.001.

GADELHA, A.I.; LIMA R., D. B. L. (2010). Artigo: Os Recursos Da Natureza – I Parte. Secex

GAITONDE, M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem J* 1967;104, 627–633

GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., MILZANI, A., FANTI, P., ROSSI, R., 2013. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat Protoc* 8, 1660–1669. Acesso em: 05 maio 2021 <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095>

GLOCK, G.E., McLEAN, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J* 55, 400–408. Acesso em: 02 maio 2021 <https://doi.org/10.1042/bj0550400>

GOMES, F.A. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia Alba*. *Food Chemistry* 273 (2019) 186–193 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.089>

GOTTILEB, O. R., & BORIN, M. R. D. M. B. (2012). Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? *Química Nova*, 35, 2105-2114 Acesso em: 18 maio 2021

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov. 1974. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/249/22/7130.long> >. Acesso em: 15 ago. 2021

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radical in biology and medicine*. 4. Ed. New York: Oxford University Press, 2008. 851 p.

HARMON, T.S. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture* (2009) 1, 58–66 doi: 10.1111/j.17535131.2008.01003.x Acessado em 8 jun 2022

HARVEY, C.J., THIMMULAPPA, R.K., SINGH, A., BLAKE, D.J., LING, G., Wakabayashi, N., Fujii, J., Myers, A., Biswal, S., Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009. 46, 443–453. Acesso em: 11 maio 2021 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>

HEINZMANN, B. M., SPITZER, V., & SIMÕES, C. M. O. (2016). Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora Acesso em: 11 dez 2021

HELDWIN CG, SILVA LL, RECKZIEGEL P, BARROS FMC, BURGER ME, Baldisserotto B, Mallmann CA, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann BM Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown essential oil. *Braz J Med Biol Res* (2012) 45:436–443

HENNEBELLE T, SAHPAZ S, JOSEPH H, BAILLEUL F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol* (2008) 116:211–222 Acesso em 03 abril 2019

HOHLENWERGWER, J.C., BALDISSEROTTO, B., COUTO, R.D., HEINZMANN, B.M., Silva, D.T. da, Caron, B.O., Schmidt, D., Copatti, C.E., 2017. Essential oil of *Lippia alba* in the transport of Nile tilapia. *Ciência Rural* 47. Acesso em: 18 maio 2019 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160040>

HYLDGAARD M, MYNGIND T, MEIER RL (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3: 1–24 Acesso em: 11 maio 2021

IBAMA. (2005). Reunião para revisão da Portaria IBAMA nº 36/03. Relatório CGREP. (Nottingham, M. & Vercillo, U. Relatores). Brasília (DF) Acesso em: 05 abril 2019

IBAMA, 2006. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa Nº. 118/2006. Acesso em: 05 abril 2019

IBAMA, 2008. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa Nº. 204/2008. Acesso em: 05 abril 2019

International Organization for Standardization (ISO). Aromatic natural raw materials - Vocabulary. ISO 9235:2013. Published 2014-09-10

JONES; D.P. Defesas contra o estresse oxidativo. In: Ross, A.C. et al. (ed). *Nutrição moderna de Shills na saúde e na doença*. 11ª ed. Barueri: Manole, 2016. Acesso em: 16 maio 2022

KOBAYASHI, M., et al. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* 2002. 7, 807–820. Acesso em 06 de fev 2021 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00561.x>

LASSO, C. A.; ROSA, R. S.; MORALES-BETANCOURT, M. A.; GARRONE-NETO, D.; CARVALHO, M. (Ed.). *Rayas de agua dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2016 Acesso em: 03 julho 2021

LIM, L.C., DHERT, P., SORGELOOS, P.,. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research* 2003 34, 923–935. Acesso em: 15 maio 2021 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00946.x>

LIMÓN-PACHECO, J; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 674, n. 1, p. 137-147, Mar. 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571808002714>>. Acesso em: 15 mar. 2021. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, v.30, n.1-2, p. 42-59, Feb.-Apr. 2009. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704241/>>. Acesso em: 02 jul. 2022. DOI: 10.1016/j.mam.2008.05.005.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, v. 224, p. 164-175, Dec. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279714003044?via%3Dihub> >. Acesso em: 14 nov. 2021. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.

MALECK, M. et al. Óleos essenciais – um breve relato. *Revista Teccen*. 2021 Jul./Dez.; 14 (2): 43-49 Acesso em: 03 maio 2022.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 15, n. 1-2, p. 75-88, Feb. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11160-005-7846-4>>. Acesso em: 10 abr. 2021. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4

MASOTTI, V., et al. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2003). 51(24), 7115-7121. Acesso em: 05 maio 2021.

MONTICINI, P., 2010. The ornamental fish trade. Production and commerce of ornamental fish: technical-managerial and legislative aspects. *GLOBEFISH Research Programme (FAO)*.

MORAIS, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2), S3299-S3302

MUKAIGASA, K., et al. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2012 32, 4455–4461. Acesso em: 05 maio 2021 <https://doi.org/10.1128/MCB.00481-12>

OECD, 2018. Ornamental Fish, Live (HS: 030110): Product Trade, Exporters and Importers [WWW Document]. *Observatory Economic Complexity*. <https://oec.world/en/profile/hs92/ornamental-fish-live?redirect=true> (accessed 2.16.21).

OLIVEIRA, S.R. de, et al. Tolerance to temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an Amazonian ornamental fish. *Acta Amazonica* 2008. 38, 773–779. Acesso em: 10 de maio de 2021 <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400023>

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.76, p.201-214, 2001. Acesso em: 16 de maio de 2019

PICHERSKY, E., & GANG, D. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, (2000). 5(10), 439-445 Acesso em: 22 jun 2020

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*, v. 97, p. 55-74, June 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 nov. 2021. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

PLOEG, A. (2013). The volume of the ornamental fish trade. *Ornamental Fish International*. Acesso em: 12 de jun 2020.

PRANG, G. An Industry Analysis Of The Freshwater Ornamental Fishery With Particular Reference To The Supply Of Brazilian Freshwater Ornamentals To The UK Market. *Uakari*, (2007). 3(1), pp.7–51. Acesso em: 15 de jun 2019

RAMÍREZ- DUARTE, W.F., PINEDA-QUIROGA, C., RUEDA, N.M., Evaluation of the use of sodium chloride, eugenol, and zeolite in confinement of *Ancistrus triradiatus*. *Orinoquia* 2013 v17, 84–95. Acesso em 10 dez 2020

RIBEIRO, J. Et Al.. Sobre A Pesca De Peixes Ornamentais Por Comunidades Do Rio Xingu, Pará – Brasil: Relato de Caso About of Ornamental Fish for Communities of The Middle Xingu River – Pará - Brazil : Narrative Case. *B. Inst. Pesca* (2009)35, 521–53

RÍOS, J.L. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. Capítulo 1. Universidade de Valencia, Espanha. 2016

ROSA, R. S., ARAÚJO, M. L. G., & CARVALHO, M. R. *Potamotrygon wallacei*. XV. Rayas de Agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II. Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Instituto Humboldt, (2016). pp. 167–172.

ROSSONI, F., FERREIRA, E. & ZUANON, J. A Pesca E O Conhecimento Ecológico Local Dos Pescadores De Acará-Disco (*Symphysodon Aequifasciatus*, Pellegrin 1904: Cichlidae) Na Reserva De Desenvolvimento Sustentável Piagaçu-Purus, Baixo Rio Purus, Brasil. *Boletim Do Museu Paraense Emilio Goeldi: Ciencias Humanas* (2014). 9, 109-128

SAMPAIO, F.D.F.; FREIRE, C.A. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries*, v.17, n.4, p.1055-1072, 2016. Acesso em: 25 de fevereiro de 2021 <https://dx.doi.org/10.1111/faf.12158>.

SANTOS, G. M. Dos. Et al. Recursos Pesqueiros E Sustentabilidade Na Amazônica: Fatos E Perspectivas. *Hiléia - Rev. Do Direito Ambient. A Amaz.* (2010). Nº 8 43–77 Acesso em: 15 de maio de 2021

SELL, C., Chemistry of essential oils. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications* 2010. CRC Press, Boca Raton, pp. 121–150

SHIBUYA et al. Neuromast distribution and its relevance to feeding in Neotropical freshwater stingrays (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Zoomorphology* (2020) 139:61–69 Acesso em: 16 de junho de 2021 <https://doi.org/10.1007/s00435-019-00472-2>

SIES, H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radic Biol Med*, v. 27, n. 9-10, p. 916-921, Nov. 1999. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158499900177X?via%3Dihub>>.
Acesso em: 14 jun 2021. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00177-X.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, v. 11, p. 613-619, Apr. 2017.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256672/> >. Acesso em: 14 jun 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035.

SIES, H.. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, v. 4, p. 180-183, Apr. 2015. Disponível em:
<www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000038?via%3Dihub >.
Acesso em: 14 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, v. 91, n. 3 (suppl. 3), p. S31-38, Sep. 1991. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934391902812> >. Acesso em: 14 jun. 2021. DOI: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.

SILVA, L.L., et al.. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2015 v17, 215–223. Acesso em: 18 de maio de 2021 http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_034

SONWA, M.M., 2000. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. Ph.D. degree, University of Hamburg, Germany.

SOUZA, C. de F., et al.,. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. *Front. Physiol.* 2019 10. Acesso em: 11 fev. 2021
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>

SOUSA, S., Meira, M., FIGUEIREDO, L., & MARTINS, E.. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. *Enciclopédia Biosfera*, (2010) 6(10)

TEO, L.H. et al. Packaging of the Guppy, *Poecilia reticulata*, for Air Transport in a Closed System. *Aquaculture*, 78 (1989) 321-332 Acessado em 26 julho 2022

TERBLANCHÉ, F.C., KORNELIUS, G., Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. *Journal of Essential Oil Research* 1996 V8,.4 71–485 Acesso em: 26 de julho de 2019

THURSTON, R.V., RUSSO, R.C., VINOGRADOV, G.A. Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the toxicity of the unionized ammonia species. *Environ. Sci. Technol* 1981 V15, 837–840. Acesso em: 15 de junho 2022 <https://doi.org/10.1021/es00089a012>
TONELLI, C., CHIO, I.I.C., TUVERSON, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 2018 V29, 1727–1745. Acesso em: dezembro de 2020
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

VANDERZWALMEN, M., et al.. The use of feed and water additives for live fish transport. *Reviews in Aquaculture* 2019 v11, 263–278. Acesso em 18 de abril de 2021. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>

VULCANO, L. A. D.; et al.. Homeostasis del glutati3n. *Acta Bioquím Clin Latinoam*, v. 47, n. 3, p. 529-539, sept. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007>. Acesso em: 12 maio. 2022.

WILD, A.C., et al. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 1999, v 274, 33627–33636. Acesso em: 3 de maio 2021. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33627>

WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling?. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 80, p. 164-170, Mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914004080>>. Acesso em: 29 abr. 2022. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017

WU, B., et al., 2020. Effects of ascorbic acid and β -1,3-glucan on survival, physiological response and flesh quality of cultured tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) during simulated transport in water. *Biology* 9, 37. Acessado em maio de 2021. <https://doi.org/10.3390/biology9020037>

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implication for health. *J Nutr*, v. 134, n. 3, p. 489-492, mar. 2004. Disponível em : <<http://jn.nutrition.org/content/134/3/489.long>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

WU, K.C., et al. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci* 123, 590–600. Acessado em 26 de jan. 2021 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr183>

YAMAMOTO, P. Y. (2006). Interaç3o gen3tipo X ambiente na produç3o e composiç3o de 3leos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Universidade de Campinas. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/dissertacoes/pb1805104.pdf>. Acessado em janeiro de 2021

YU, Z. et al., Monitoring oxidative stress, immune response, Nrf2/NF- κ B signaling molecules of *Rhynchocypris lagowski* living in BFT system and exposed to waterborne ammonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2020 v205, 111161. Acessado em març3o 2021 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111161>