

KARINA VENTURA BOECHAT MARTINS

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA E DO SAL COMUM
NO TRANSPORTE DE LONGA DURAÇÃO DE *Cyprinus carpio***

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

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon

Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro
Pollyanna de Moraes França Ferreira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

M386e
2022

Martins, Karina Ventura Boechat, 1995-
Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal
comum no transporte de longa duração de *Cyprinus carpio* /
Karina Ventura Boechat Martins. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (80 f.): il.

Inclui anexos.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.625>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peixes ornamentais - Transporte. 2. Antioxidantes.
3. Cloreto de sódio. 4. Extratos vegetais. I. Zuanon, Jener
Alexandre Sampaio, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 597.483

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

KARINA VENTURA BOECHAT MARTINS

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO ÓLEO DE CRAVO-DA-ÍNDIA E DO SAL COMUM
NO TRANSPORTE DE LONGA DURAÇÃO DE *Cyprinus carpio***

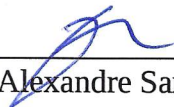
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2022

Assentimento:



Karina Ventura Boechat Martins
Autora



Jener Alexandre Sampaio Zuanon
Orientador

A **Deus**, por toda força, proteção e por sempre guiar os meus passos. Aos meus pais, **Cleonice** e **Joaquim**, por todo amor, direcionamento, apoio e incentivo dedicados a mim. Sem vocês, eu não seria nada. Aos meus irmãos, **Leonardo** e **Gabriela**, por serem meu porto seguro. Ao meu amor, **Michel**, por todo suporte e apoio na vida e no desenvolvimento desse trabalho. Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jener**, por ser o principal pilar da minha formação profissional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)**, por ser minha segunda casa desde a graduação e por ter sido sede das maiores e melhores conquistas da minha vida profissional, e ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, por toda oportunidade, pelo suporte concedido e pelo trabalho exemplar que tornou essa experiência muito mais fácil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, por ser o maior incentivador da minha vida acadêmica, uma vez que diante das dificuldades, sempre relembra o meu potencial, o que me confere forças para nunca desistir, feito que talvez nem ele saiba. Agradeço muito pela oportunidade de ter sido aluna, estagiária e mestranda sob a orientação de um profissional tão inspirador e exemplar. Espero um dia poder ser uma profissional (e também uma pessoa) assim como você. Você é a minha maior referência profissional e tenho muito orgulho disso.

Às minhas coorientadoras **Prof.^ª. Dr.^ª. Ana Lúcia Salaro** e **Dr.^ª. Pollyanna de Moraes França Ferreira**, pela disponibilidade, ensinamentos e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

A **Prof.^ª Dr.^ª Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do **Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (DBA/UFV)** para as análises de estresse oxidativo e para o armazenamento e conservação das amostras experimentais, além da preocupação diária com o desenvolvimento e sucesso das análises, sempre perguntando se estava tudo certo e disposta a contribuir, caso não estivesse.

Aos **professores** que tive durante o mestrado, por todo conhecimento compartilhado.

A doutoranda, **Stella Bicalho Silva**, por toda boa vontade e disposição em me ajudar durante a montagem e desmontagem do experimento, e por todo auxílio e ajuda no desenvolvimento das análises de estresse oxidativo, do início ao fim, durante 3 meses. A sua companhia e ensinamentos foi de extrema relevância para o desenvolvimento desse trabalho e para a experiência, que apesar de ter sido desgastante, ter se tornado mais leve e divertida. Você é uma amiga que o mestrado me trouxe e que hoje levo no coração.

Ao **Dr. Alex Júnio da Silva Cardoso**, por ser um amigo desde a graduação e por compartilhar tanto conhecimento desde então. Por ter ajudado desde o delineamento até o desenvolvimento do projeto. E principalmente, por ter auxiliado no desenvolvimento das análises estatísticas desse trabalho. Poder contar com seu conhecimento, amizade e disposição

foi crucial para minha sanidade mental durante essa fase. Você é um amigo que eu vi crescer profissionalmente e que me inspirei sempre, estarei sempre na torcida (e na comemoração) por suas conquistas. Você é luz.

A doutoranda **Juliana Rodrigues Gomes**, por ter sido companheira fiel no primeiro ano de mestrado, sempre me escutando, ajudando, amparando quando o peso das obrigações gritava muito alto. No período de desenvolvimento da ideia desse projeto, foi quem sempre esteve ao meu lado, aconselhando e encorajando. Ter ajudado no seu projeto de mestrado, com certeza me tornou mais preparada para conduzir o meu. Poder contar com sua amizade e ajuda conferiu a essa caminhada leveza e felicidade. Você é uma grande amiga que o mestrado me deu e por quem eu sempre irei torcer. Sua garra e determinação vão te levar longe.

Ao mestre **Felipe Martins dos Santos**, por toda ajuda, amizade, conselhos e convivência durante esse período de mestrado. Sua disponibilidade no desmonte do experimento fez toda diferença para que eu conseguisse ter o número de pessoas ideal para todas as coletas, o que tornou o dia muito mais leve e feliz. Sua presença sempre foi leve e me trouxe muito acolhimento em todos nossos encontros no laboratório e além dele.

Aos demais colegas de equipe do **Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP)**, que compartilharam comigo algum momento de descontração, aprendizado, desespero, auxílio, amparo e risadas. Principalmente os que viveram essa fase comigo, **Alisson Luiz Martins Duarte, Caio William Magalhães Souza, Daniele Gomes dos Santos, Dante Feital Gjorup, Felipe Martins dos Santos, Filipe Silveira Azevedo, Jheneze Guimarães Pereira Rocha, Juliana Rodrigues Gomes e Maria Tatiana Soares Martins**, por todas experiências trocadas no decorrer desses anos, por todo café compartilhado, toda lamúria e por toda ajuda, principalmente aos que ajudaram na montagem e desmontagem do experimento. Vocês foram e são especiais demais.

Aos demais amigos do Departamento de Biologia Animal, **Filipe Iglesias, Lorene Reis, Renata Freitas, Maria Luiza Rodrigues**, por todos almoços compartilhados no RU, por toda troca, ajuda e amizade durante esses anos. Vocês fazem parte dos que tornaram a caminhada mais leve e feliz.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, **Nilo Sérgio de Souza e Lúcia Helena Campos**, pela boa disposição de sempre ajudar no que fosse preciso. Ao técnico **Donizete Aparecido da Silva**, por todo auxílio e suporte fornecidos sempre que necessário. Ao secretário do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, **Adnilson Antônio Brasileiro**, por todos os esclarecimentos e amparo desde a inscrição ao programa até a defesa.

Aos meus pais, **Cleonice Maria Ventura Martins** e **Joaquim Florêncio Martins Filho**, por sempre incentivarem a minha educação e nunca medirem esforços para eu chegar onde estou hoje. O amor de vocês me sustenta e ampara.

Aos meus irmãos, **Leonardo Ventura Martins** e **Gabriela Ventura Boechat Martins**, por sempre estarem presente em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis e por nunca me abandonarem. Vocês são minha rocha e fortaleza nessa vida.

Ao meu amor, **Michel Silva Ferraz**, por ser um grande incentivador dos meus sonhos e por ter sido meu maior amparo, refúgio e também ajudante no decorrer do desenvolvimento desse trabalho. Sem essa ajuda, no cenário pandêmico que vivemos, não seria possível entregar esse trabalho dentro do prazo. Você é a minha maior segurança.

A minhas amigas desde a graduação, **Bárbara Silva Linhares**, **Bianca de Souza Araújo Adão** e **Thercia Rocha Balbino** por serem sempre presentes, mesmo que agora distante fisicamente. Principalmente a **Bárbara** por estar mais presente, sempre me visitando no laboratório e sendo companhia nos rolês. Contar com a companhia, amizade e zelo de vocês, dentro e fora das quatro pilastras, fez e faz toda diferença em minha vida. Vocês se tornaram parte da minha família, a minha família de Viçosa.

Aos demais **familiares** e **amigos** que contribuíram e torceram para que isso fosse possível.

Muito obrigada!

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

(Charles Darwin)

RESUMO

MARTINS, Karina Ventura Boechat, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal comum no transporte de longa duração de *Cyprinus carpio***. Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro e Pollyanna de Moraes França Ferreira.

O óleo essencial de cravo (OEC) é amplamente utilizado como sedativo, inclusive no transporte de peixes, entretanto, há evidências de que o OEC causa efeitos colaterais como respostas de estresse e estresse oxidativo. Uma das formas de reduzir tais efeitos é a utilização de aditivos em associação com o OEC, que apresentem propriedades mitigadoras dos efeitos colaterais ou mesmo ações complementares ou sinérgicas. Dentre estes, o sal comum destaca-se em função de seu efeito redutor de estresse, baixo custo e boa disponibilidade. Deste modo, objetivamos avaliar a eficácia e segurança do OEC e do sal comum, usados isoladamente e em associação, como aditivos na água de transporte de *Cyprinus carpio*. Foram realizados dois experimentos com o mesmo delineamento experimental, diferindo apenas quanto ao tempo para a realização da coleta de amostras após o transporte, sendo o primeiro experimento utilizado para análises logo após o transporte e o segundo, para análises 96 h após o transporte, permitindo assim a avaliação da possibilidade de recuperação dos peixes dos efeitos do transporte. Ambos foram realizados em esquema fatorial 4x2, em DIC, com um tratamento adicional (antes do transporte). Foram avaliadas quatro concentrações de OEC (0; 5; 10 e 15 mg L⁻¹) e duas concentrações de sal comum (0 e 3 g L⁻¹), com três repetições por tratamento. Os peixes foram embalados em 48 sacos plásticos com 12 peixes/unidade experimental, sendo que a metade foi utilizada para a realização das análises logo após o transporte (24h) e a outra metade, 96h após o transporte para as análises de recuperação do transporte. Não houve mortalidade dos peixes tanto imediatamente, quanto 96h após o transporte. Quanto as respostas de estresse, o OEC não apresentou efeito imediatamente após o transporte. Entretanto, após 96h desencadeou aumento na glicemia em todas concentrações. Já o sal, reduziu a glicemia apenas logo após o transporte. O OEC (10 e 15 mg L⁻¹) causou aumento da amônia não ionizada (ANI) na água de transporte, porém tal efeito foi mitigado pela associação com o sal comum. A redução da ANI desencadeada pelo sal indica que este diminuiu o gasto energético com osmorregulação e, por isso, diminuiu o catabolismo de aminoácidos e a excreção de amônia. Nas brânquias, logo após o transporte, o OEC (10 e 15 mg L⁻¹), apesar de ter proporcionado maior atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD e glutathione S-transferase - GST), também causou aumento de espécies reativas (óxido nítrico - ON), de danos em lipídios (malondialdeído -

MDA) e em proteínas (proteínas carboniladas - PC), resultados que indicam que o uso do OEC isoladamente não é seguro. O sal isoladamente, ou em associação com o OEC, praticamente não causou efeitos no status redox nas brânquias logo após o transporte. Entretanto, no fígado, o sal causou aumento em PC e MDA, resultados que indicam que o uso do sal isoladamente também não é seguro. Contudo, tais efeitos foram mitigados pela associação com OEC, particularmente na concentração de 5 mg L⁻¹. Após 96h do transporte, tanto o OEC quanto o sal isolado, causaram efeitos adversos semelhantes nas brânquias (aumento de ON e PC em relação aos valores antes do transporte). Entretanto, quando em associação, causaram redução em ON e PC e aumento na atividade da CAT, o que indica que sua associação pode mitigar efeitos colaterais. Deste modo, a utilização destes aditivos em associação (5 mg L⁻¹ de OEC + 3 g L⁻¹ de sal comum) se mostrou eficaz e segura, pois proporcionou melhor manutenção da qualidade da água (menor teor de amônia) e do status redox nas brânquias e no fígado de *C. carpio* submetidos ao transporte de longa duração.

Palavras-chave: Antioxidantes. Cloreto de sódio. Extratos vegetais. Peixes ornamentais. Sedação.

ABSTRACT

MARTINS, Karina Ventura Boechat, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Efficacy and safety of clove oil and common salt in the long-term transport of *Cyprinus carpio***. Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisers: Ana Lúcia Salaro and Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Clove essential oil (OEC) is widely used as a sedative, including in fish transport, however, there is evidence that OEC causes side effects such as stress responses and oxidative stress. One of the ways to reduce such effects is using additives in association with the OEC, which have mitigating properties of side effects or even complementary or synergistic actions. Among these, common salt stands out due to its stress-reducing effect, low cost, and good availability. Thus, we aimed to evaluate the efficacy and safety of OEC and common salt, used alone and in association, as additives in the transport water of *Cyprinus carpio*. Two experiments were carried out with the same experimental design, differing only in terms of the time taken to carry out the collection of samples after transport, the first experiment being used for analysis immediately after transport and the second, for analysis 96 h after transport, allowing thus assessing the possibility of recovering fish from the effects of transport. Both were performed in a 4x2 factorial scheme, in DIC, with an additional treatment (before transport). Four concentrations of OEC (0; 5; 10 and 15 mg L⁻¹) and two concentrations of common salt (0 and 3 g L⁻¹) were evaluated, with three replications per treatment. Fish were packed in 48 plastic bags with 12 fish/experimental unit, half of which was used to carry out the analyzes immediately after transport (24h) and the other half, 96h after transport, for the analysis of transport recovery. There was no fish mortality either immediately or 96h after transport. As for the stress responses, the OEC had no effect immediately after transport. However, after 96h it triggered an increase in blood glucose in all concentrations. Salt, on the other hand, reduced blood glucose only right after transport. The OEC (10 and 15 mg L⁻¹) caused an increase in non-ionized ammonia (NIA) in the transport water, but this effect was mitigated by the association with common salt. The reduction in NIA triggered by salt indicates that it reduced energy expenditure with osmoregulation and decreased amino acid catabolism and ammonia excretion. In the gills, soon after transport, the OEC (10 and 15 mg L⁻¹), despite having provided greater activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD and glutathione S-transferase - GST), also caused an increase in reactive species (nitric oxide - NO), damage to lipids (malondialdehyde - MDA) and proteins (carbonylated proteins - CP), results that indicate that the use of OEC alone is not safe. The salt alone, or in association with the OEC, had

practically no effect on the oxidative status in the gills soon after transport. However, in the liver, salt caused an increase in CP and MDA, results that indicate that the use of salt alone is also not safe. However, such effects were mitigated by the association with OEC, particularly at the concentration of 5 mg L⁻¹. After 96h of transport, both the OEC and the salt alone caused similar adverse effects on the gills (increase in NO and CP in relation to the values before transport). However, when in association, they caused a reduction in NO and CP and an increase in CAT activity, which indicates that their association can mitigate side effects. Thus, the use of these additives in association (5 mg L⁻¹ of OEC + 3 g L⁻¹ of common salt) proved to be effective and safe, as it provided better maintenance of water quality (lower ammonia content) and oxidative status in the gills and liver of *C. carpio* subjected to long-term transport.

Keywords: Antioxidants. Sodium chloride. Ornamental fish. Sedation. Vegetable extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) nas mitocôndrias, com formação de espécies reativas de oxigênio e água (H_2O) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo de cravo fornecida pelo fabricante (LASZLO®).	46
Tabela 2. Valores médios para as variáveis de qualidade da água logo após o transporte.....	51
Tabela 3. Valores médios para glicose e lactato sanguíneo de <i>C. carpio</i> logo após o transporte.	53
Tabela 4. Valores médios para as variáveis do status redox nas brânquias de <i>C. carpio</i> logo após o transporte.....	55
Tabela 5. Valores médios para as variáveis do status redox no fígado de <i>C. carpio</i> logo após o transporte.	57
Tabela 6. Valores médios para glicose e lactato sanguíneo de <i>C. carpio</i> 96 horas após o transporte.	59
Tabela 7. Valores médios para as variáveis do status redox nas brânquias de <i>C. carpio</i> 96 horas após o transporte.....	62
Tabela 8. Valores médios para as variáveis do status redox no fígado de <i>C. carpio</i> 96 horas após o transporte.....	64

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	14
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2. Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal comum no transporte de longa duração de <i>Cyprinus carpio</i>	36
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. ANIMAIS E CONDIÇÕES PRÉ-EXPERIMENTAIS	41
2.1.1. QUALIDADE DE ÁGUA	41
2.1.2. RESPOSTAS DE ESTRESSE	41
2.1.3. MARCADORES OXIDATIVOS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES	41
2.1.3.1. ÓXIDO NÍTRICO	42
2.1.3.2. MALONDIALDEÍDO	42
2.1.3.3. PROTEÍNAS CARBONILADAS	43
2.1.3.4. ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE	44
2.1.3.5. ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE.....	44
2.1.3.6. ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	45
2.2. TRANSPORTE DOS PEIXES.....	45
2.2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DURANTE O TRANSPORTE	46
2.2.1.1. TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.....	47
2.2.1.2. QUALIDADE DE ÁGUA.....	47
2.2.1.3. RESPOSTAS DE ESTRESSE	47
2.2.1.4. MARCADORES OXIDATIVOS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES	47
2.2.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DURANTE A RECUPERAÇÃO DO TRANSPORTE	47
2.2.2.1. TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.....	48
2.2.2.2. RESPOSTAS DE ESTRESSE	48
2.2.2.3. MARCADORES OXIDATIVOS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES	48
2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
3. RESULTADOS	49
3.1. EFEITOS DO TRANSPORTE	49

3.2.EFICÁCIA E SEGURANÇA DO ÓLEO DE CRAVO E DO SAL COMUM APÓS O TRANSPORTE DE <i>C. CARPIO</i>	49
3.2.1.QUALIDADE DE ÁGUA LOGO APÓS O TRANSPORTE	49
3.2.2.RESPOSTAS DE ESTRESSE LOGO APÓS O TRANSPORTE	52
3.2.3.STATUS REDOX NAS BRÂNQUIAS LOGO APÓS O TRANSPORTE.....	54
3.2.4.STATUS REDOX NO FÍGADO LOGO APÓS O TRANSPORTE	56
3.3.EFEITOS DO ÓLEO DE CRAVO E DO SAL COMUM SOBRE A RECUPERAÇÃO DE <i>C. CARPIO</i> SUBMETIDOS AO TRANSPORTE	58
3.3.1.RESPOSTAS DE ESTRESSE 96 H APÓS O TRANSPORTE	58
3.3.2.STATUS REDOX NAS BRÂNQUIAS 96 H APÓS O TRANSPORTE.....	60
3.3.3.STATUS REDOX NO FÍGADO 96 H APÓS O TRANSPORTE.....	63
4.DISSCUSSÃO	65
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	78
ANEXO I: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO (CEUAP).	79
ANEXO II: NÍVEIS DE GARANTIA DA RAÇÃO TEC PEIXE 45 FORNECIDOS PELA FABRICANTE SOMA NUTRIÇÃO ANIMAL.....	80

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

A comercialização de peixes ornamentais é considerada uma importante atividade econômica que inclui mais de 120 países que realizam a criação, importação e exportação de peixes, crustáceos, moluscos, plantas aquáticas, dentre outros (WEERAKOON & WEERAKOON, 2020). Porém, as informações a respeito dos valores decorrentes das vendas de peixes ornamentais e de acessórios associados ao aquarismo são pouco conhecidas e desatualizadas (WEERAKOON & WEERAKOON, 2020). De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2018), no período de 2013 a 2018, houve um crescimento acumulado de 6,1% na comercialização de peixes ornamentais no Brasil, atingindo um total de 19,1 milhões de espécimes em 2018. Devido ao isolamento social causado pela pandemia gerada pelo COVID-19, a comercialização de peixes ornamentais e outros itens para aquarismos ganhou ainda mais destaque e apresentou um crescimento de 5% somente em 2020, de acordo com a Acquabras - Associação de Criadores e Aquaristas do Brasil (JAWORSKI, 2021).

Para atender o mercado de peixes ornamentais, tanto no atacado como no varejo, o transporte é uma etapa essencial na criação e comercialização de peixes (HARMON, 2009; VANDERZWALMEN et al., 2021). As principais diferenças entre os tipos de transportes são baseadas no recipiente utilizado, duração, tempo de jejum antes do transporte, densidade de estocagem, adaptações respiratórias, osmorregulatórias e a tolerância ao estresse das diferentes espécies (PORTZ, WOODLEY & CECH, 2006; SAMPAIO & FREIRE, 2016). Com relação ao recipiente utilizado, o transporte de peixes pode ser classificado em sistema aberto ou fechado (BERKA, 1986). O sistema aberto consiste em tanques ou caixas com água contendo altas densidades de estocagem, onde a oxigenação da água é feita por meio de compressores de ar, ou pela injeção de oxigênio puro através de cilindros de oxigênio comprimido (BERKA, 1986; GOMES, 2003). Este tipo de transporte é o mais indicado para peixes com mais de 100 gramas e normalmente é realizado através de vias rodoviárias, em caminhões, para curtas distâncias (GOMES, 2003). O sistema fechado consiste na utilização de sacos plásticos selados contendo cerca de um terço de seu volume com água e dois terços com oxigênio puro (BERKA, 1986; GOMES, 2003a). A quantidade de oxigênio pode ser reduzida quando a espécie a ser transportada apresenta respiração aérea. Este tipo é o mais utilizado para transportar peixes ornamentais a longas distâncias, por via rodoviária ou por via aérea (PRAMOD et al., 2010).

O transporte é considerado curto quando sua duração é menor que oito horas, e longo quando excede esse tempo (STIEGLITZ, BENETTI & SERAFY, 2012). No transporte de curta duração, o principal problema enfrentado é a diminuição do pH da água, devido à liberação de CO_2 decorrente da respiração celular dos peixes (SAMPAIO & FREIRE, 2016). A produção de CO_2 durante o transporte frequentemente é maior do que a basal devido ao aumento do metabolismo característico das respostas de estresse em peixes (PORTZ, WOODLEY & CECH, 2006; HANNAN & RUMMER, 2018). Os efeitos do CO_2 devem ser considerados tanto no sangue como na água, pois o CO_2 reage com a água e forma ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia em bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ . No sangue, o H^+ se liga à hemoglobina e causa diminuição da sua afinidade pelo oxigênio, com pequena redução na sua captação através das brânquias (HANNAN & RUMMER, 2018). Na água o H^+ pode causar mais de um efeito, como distúrbios na capacidade de equilíbrio ácido básico, na secreção de muco pelo epitélio branquial e na capacidade de excreção de amônia (RANDALL & LIN, 1993). Entretanto, em transportes de longa duração, a excreção de CO_2 tende a diminuir e se estabilizar e, portanto, o maior problema enfrentado no transporte de longa duração é o acúmulo de amônia não ionizada (NH_3) (SAMPAIO & FREIRE, 2016). A amônia, proveniente do catabolismo de aminoácidos, necessário para a manutenção da homeostase glicêmica, é excretada principalmente através das brânquias (WILKIE, 1997). O aumento na concentração de NH_3 na água dificulta sua excreção pela redução de seu gradiente de concentração entre sangue e água, o que pode causar intoxicação e morte dos peixes (RANDALL & TSUI, 2002).

A depreciação da qualidade da água é influenciada pela densidade de estocagem e tamanho dos peixes (BARCELLOS et al., 2006; SAMPAIO & FREIRE, 2016). Do ponto de vista econômico, quanto maior a densidade, menor o custo associado ao transporte. Contudo, altas densidades podem desencadear respostas de estresse nos peixes (CARNEIRO & URBINATI, 2002; GOMES et al., 2003b) e depreciar mais rapidamente a qualidade da água (BRAUN & NUÑER 2014) por exacerbar os efeitos indesejáveis citados anteriormente.

Os manejos que antecedem o transporte como captura, manuseio, seleção, confinamento, mudanças na qualidade da água (YOUNG et al., 2019) e o próprio transporte são fatores causadores de estresse em peixes (DE CARBALHO GOMES, ROUBACH & ARAUJO-LIMA, 2002; HARMON, 2009; VANDERZWALMEN et al., 2019). Os fatores estressores podem ser classificados como agudos, quando a exposição é de curto prazo, ou como crônicos quando os animais são mantidos em situações de estresse a longo prazo (DAVIS, 2006). No ambiente natural, as respostas de estresse agudo preparam o animal para enfrentar ou escapar de situações adversas. Portanto, representa vantagem adaptativa, à medida que

favorece a sobrevivência do animal (WENDELAAR BONGA, 1997). Entretanto, em ambientes de cultivo, as respostas de estresse não são desejadas por causar distúrbios na homeostase (FRANCIS-FLOYD, 2002). Quando o estresse é crônico, o organismo perde a capacidade de regular a liberação dos hormônios de estresse, o que resulta na inibição do crescimento, da reprodução e da atividade do sistema imune (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002). Devido à duração dos transportes, a maioria dos manejos relacionados desencadeiam respostas de estresse agudo.

As respostas fisiológicas compensatórias desencadeadas pelos fatores estressores são classificadas como primárias, secundárias e terciárias (MAZEAUD et al., 1977; IWAMA, 1998). As primárias são respostas neuroendócrinas marcadas pelo aumento dos níveis plasmáticos dos hormônios do estresse, catecolaminas e cortisol (IWAMA, 1998). Diferentes fatores estressores são percebidos pelos peixes através de diversos sistemas sensoriais, que alcançam diferentes áreas do sistema nervoso, incluindo o hipotálamo. A partir desta estrutura encefálica, são ativados o sistema nervoso autônomo simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-tecido interrenal (IWAMA, 1998). As respostas fisiológicas que ocorrem mais rapidamente são ativadas pelo sistema nervoso autônomo simpático, com a liberação do neurotransmissor noradrenalina junto aos órgãos efetores. O simpático também estimula as células cromafins na porção cefálica dos rins, que causa liberação de adrenalina e noradrenalina no sangue (BARTON & IWAMA, 1991). A ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-tecido interrenal (HHI) causa a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que por sua vez, estimula a hipófise a liberar corticotropina (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH estimula as células interrenais a produzirem glicocorticoides, principalmente o cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997). Adrenalina, noradrenalina e cortisol, atuando nos tecidos alvo, desencadeiam as respostas secundárias, caracterizadas pelo aumento dos níveis de glicose plasmática, redução das reservas de glicogênio, aumento da ventilação branquial, distúrbios hidroeletrólíticos e alterações hematológicas (IWAMA, 1998; VAN DER BOON, VAN DEN THILLART & ADDINK, 1991). As respostas terciárias são desencadeadas apenas quando a exposição ao fator estressor é crônica. Neste estágio, ocorre a redução da ingestão de alimentos e das reservas energéticas, catabolismo de proteínas e aminoácidos, inibição da atividade do sistema imune e redução da capacidade de cicatrização de feridas, o que compromete o crescimento e a reprodução, com aumento da suscetibilidade a doenças (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002; BRANDÃO, GOMES & CHAGAS, 2006). Portanto, o monitoramento das variáveis fisiológicas classificadas como respostas primárias e secundárias de estresse pode favorecer o sucesso do transporte de peixes (HARMON, 2009).

Em transportes de curta duração o teor de oxigênio dissolvido na água frequentemente é suficiente para atender as necessidades dos peixes. Contudo, em longa duração, com a utilização de sacos plásticos selados, pode ocorrer declínio dos níveis de oxigênio dissolvido, com aumento na produção de lactato e conseqüente distúrbio na capacidade de manutenção do equilíbrio ácido-base pelos peixes (GOLOMBIESKI et al., 2003; SAMPAIO & FREIRE, 2016). A exposição dos peixes a condições de hipóxia pode desencadear estresse oxidativo em diversos tecidos, principalmente nas brânquias e fígado (LIVINGSTONE, 2003), com prejuízos para o funcionamento das membranas celulares, das proteínas e dos ácidos nucleicos (LUSHCHAK, 2011).

O oxigênio é essencial para a síntese de ATP nas mitocôndrias, onde atua comoceptor final de elétrons. Entretanto, durante este processo, também são formadas espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMOS), que podem ser de duas categorias, radicais livres e não radicais. Átomos ou moléculas que apresentam número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, são considerados radicais livres como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2) são não radicais. Apesar de não apresentar desemparelhamento de elétrons na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, uma vez que participa da produção de OH^{\cdot} (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Durante o metabolismo do oxigênio, duas moléculas de O_2 sofrem redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de duas moléculas de H_2O (Figura 1). Intermediários reativos são formados neste processo, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e hidroxila (OH), e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A completa redução do O_2 neutraliza as espécies reativas, contudo pequenas porcentagens destas espécies reativas não são neutralizadas durante a redução do O_2 na formação de ATP nas mitocôndrias (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), que além de causar danos por si só, contribuem para a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), de enxofre (ERS), de cloro (ERCI) e de carbono (ERC) (VASCONCELOS et al., 2007). Apesar do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ser pouco reativo, ele pode interagir com outras moléculas como o NO^{\cdot} e gerar RNS, como o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; KOURY & DONANGELO et al., 2003; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, que pode ser sintetizado por diversas isoformas das enzimas óxido nítrico sintetase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina a $NO^{\cdot} + L$ -citrulina (VASCONCELOS et al., 2007). O NO participa de diversos processos fisiológicos como vasodilatação, neurotransmissão e regulação do sistema imune. Porém, quando em excesso pode reagir com o

radical superóxido e formar o radical peroxinitrito (ONOO-), potente oxidante, causador de danos em moléculas biológicas como grupos S-H das proteínas, além de hidroxilação e nitração de compostos aromáticos, que causam danos às células (VASCONCELOS et al., 2007).

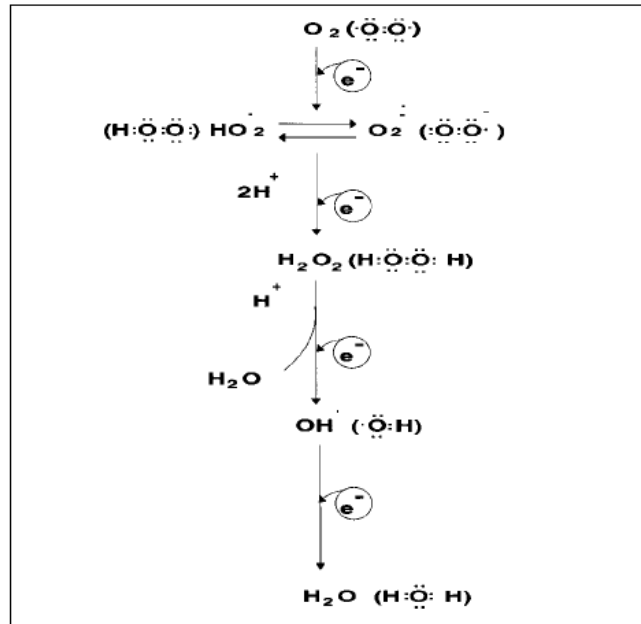


Figura 1. Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O₂) nas mitocôndrias, com formação de espécies reativas de oxigênio e água (H₂O) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Devido à alta reatividade e capacidade de gerar danos das ROS, o metabolismo do oxigênio possui um rígido controle celular, de forma a minimizar a formação de espécies reativas de oxigênio e consequentemente, espécies reativas de outros elementos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015) uma vez que causam danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que podem levar à morte celular (LUSHCHAK, 2011). O organismo possui defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas que neutralizam as ROS e minimizam os danos desencadeados pelas ROS e demais espécies reativas. As principais defesas enzimáticas são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (G-px), glutaciona redutase (GRED) e glutaciona-S-transferase (GST), e os não enzimáticos são representados pela vitamina C, vitamina E, tocoferol, tióis, carotenoides, glutaciona e compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides, entre outros (LUSHCHAK, 2011; PEREIRA & DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012). Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a vitamina C se destaca por seu alto poder antioxidante. A oxidação desta vitamina pela doação de H⁺, na presença de ROS, converte estas moléculas em formas menos reativas. A vitamina C também atua regenerando a vitamina E após sua oxidação por espécies reativas, bem como pela redução de metais de transição (Fe e Cu) e assim, diminuindo a formação de ROS, o que evita a reação de H₂O₂ com os metais de transição (CHENG et al., 2018; HOSSAIN et al., 2018). O desequilíbrio entre a

geração e a neutralização de ROS é conhecido como estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio podem ser de origem endógena ou exógena. Assim, além da redução do O₂ até H₂O nas mitocôndrias, também são fontes endógenas as reações do O₂ com o Fe⁺⁺⁺ (reações de Fenton e Haber), a ação das enzimas monoamina oxidase, NADPH redutase, xantina oxireductase, entre outras (NOORI, 2012). Dentre as fontes exógenas, destacam-se os pesticidas, metais pesados e fatores ambientais como variações no teor de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e osmolaridade da água (CHOWDHURY & SAIKIA, 2020). Dessa forma, diversos manejos utilizados na criação de peixes podem representar fatores causadores de estresse oxidativo, uma vez que envolvem captura e exposição dos peixes ao ar, e consequente variação no suprimento de oxigênio, uso do sal comum para controle de ectoparasitos, bem como as mudanças de temperatura e qualidade de água associadas ao transporte de peixes vivos.

Os aditivos têm sido estudados e empregados na água visando reduzir ou mitigar as respostas de estresse e estresse oxidativo desencadeadas pelas práticas de manejo e transporte durante a criação de peixes (SAMPAIO & FREIRE, 2016; HARMON, 2009; VANDERZWALMEN et al., 2019). Os aditivos mais utilizados são os probióticos, sal comum e sedativos/anestésicos (CROSBY et al., 2006; HARMON, 2009; BIDHAN et al., 2014).

Os probióticos são microrganismos vivos que promovem efeitos benéficos por meio da redução de populações de microrganismos indesejáveis, o que favorece a manutenção da qualidade da água e a saúde dos peixes (GILDBERG et al., 1997; IGE, 2013; MOHAPATRA et al., 2013; BIDHAN et al., 2014).

O sal comum é bastante utilizado durante o manejo e transporte de peixes por diminuir os gradientes osmóticos e iônicos entre o meio interno e externo (água doce), o que reduz o gasto energético e auxilia na manutenção da homeostase (MCDONALD & MILLIGAN et al., 1997; CROSBY et al., 2006). Além disso, o sal na água também pode estimular a produção de muco (MIFSUD & ROWLAND, 2008), controlar ectoparasitos e prevenir doenças (TACCHI et al., 2015; MIRGHAED & GHELICHPOUR, 2019). Com relação aos efeitos sobre as respostas de estresse, o sal tem mostrado diferentes efeitos em diferentes espécies de peixes. Para *Morone saxatilis* (MAZIK, SIMCO & PARKER, 1991), *Brycon cephalus* (CARNEIRO & URBINATI, 2001), *Cyprinus carpio* (MIRGHAED & GHELICHPOUR, 2019) e *Astyanax altiparanae* (SALARO et al., 2015) o sal promoveu redução das respostas de estresse. Porém, em outras espécies como pacamã *Lophiosilurus alexandri* (FAVERO et al., 2019) e tambaqui *Colossoma macropomun* (GOMES et al., 2003b) o sal não influenciou as respostas de estresse.

Em *Arapaima gigas*, BRANDÃO et al. (2008) observaram que o sal não apresentou efeito sobre as respostas de estresse porém, GOMES et al. (2006) relataram que para essa espécie o uso do sal deve ser evitado por causar distúrbios osmorregulatórios. Para *Pangasianodon hypophthalmus* (BOAVENTURA et al., 2021) e *Salmo gairdneri* (BARTON & PETER, 1982) o sal desencadeou aumento na glicemia e no teor de cortisol. Portanto, as respostas dos peixes de água doce à salinidade da água são espécie-específica. Além disso, até o momento ainda não foram avaliados os efeitos da adição de sal na água sobre o status redox dos peixes de água doce.

Os sedativos e anestésicos podem ser sintéticos ou naturais (HOSEINI, MIRGHAED, & YOUSEFI, 2019) e são empregados na aquicultura com o objetivo de reduzir as respostas de estresse, o metabolismo dos peixes, e assim, diminuir o consumo de oxigênio, a produção de CO₂ e a excreção de amônia na água (HARMON, 2009). Os sintéticos mais utilizados são a triclaína metassulfonato (MS-222), fenoxietanol, benzocaína, metomidato, etomidato, sulfato de quinaldina, propofol e cloridrato de cetamina (AYDIN & BARBA, 2020; STOSKOPF & POSNER, 2008; PRIBORSKY & VELISEK, 2018). Apesar de sua eficácia, alguns deles não são completamente seguros para os peixes devido aos efeitos colaterais que podem causar, como aumento do tônus muscular, hiperatividade, secreção excessiva de muco, irritação em brânquias e danos em córneas (MIRGHAED, GHELICHPOUR & HOSEINI, 2016; CUNHA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017). Os naturais são provenientes do metabolismo secundário de plantas e geralmente são comercializados na forma de óleos essenciais (EO) (BERG & LUBERT, 2008; PEREIRA & DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012). Dentre as plantas com propriedades sedativas/anestésicas para peixes, destacam-se *Eugenia aromática* (HISANO et al., 2008; MOREIRA et al., 2010), *Eugenia caryophyllata* (INOUE, SANTOS NETO & MORAES, 2003; SOLTANI et al., 2004), *Lippia alba* (DA CUNHA et al., 2010; CÁRDENAS et al., 2016), *Aloysia triphylla* (PARODI et al., 2014; BECKER et al., 2017), *Mentha* sp (METIN et al., 2015; CAN & SÜMER, 2019), *Ocimum* sp (BENOVIT et al., 2012; SILVA et al., 2015) e *Melaleuca alternifolia* (HAJEK, 2011; CORREIA et al., 2017). Os principais compostos ativos que promovem sedação/anestesia são: eugenol, mentol, mirceno, 1,8-cineol, linalol, limoneno, citronelal, timol e carvacrol (AYDIN & BARBA, 2020). Os princípios biologicamente ativos destas plantas além de reduzirem o metabolismo e a atividade do animal, também possuem propriedades antioxidante, antimicrobiana, redutora de estresse e imuno estimulante (SACCOL et al., 2017; COSTA, 2002; DA CUNHA et al., 2010) o que pode prevenir ou atenuar infecções, respostas de estresse e estresse oxidativo.

Os sedativos utilizados na aquicultura, além de eficazes e seguros, devem ser de fácil obtenção e apresentar um balanço positivo na relação custo/benefício de seu uso (MITJANA et al., 2014). Um OE é considerado eficaz e seguro como sedativo quando o peixe apresenta a capacidade de recuperar da sedação e voltar ao estado normal, sem prejuízos na saúde e sobrevivência do mesmo (MARKING & MEYER, 1985). Os efeitos do sedativo na saúde do peixe podem ser avaliados através de variáveis fisiológicas, bioquímicas e comportamentais como, o status redox, as respostas de estresse, o equilíbrio hidromineral, condição imunológica e comportamento alimentar (DA CUNHA et al., 2010; HOSEINI, 2011; GRESSLER et al., 2014; BECKER et al., 2017). Além disso, é importante avaliar estas variáveis em diferentes órgãos para garantir a total segurança na utilização do anestésico, principalmente brânquias e fígado, uma vez que as brânquias estão diretamente expostas ao anestésico (NEIFFER & STAMPER, 2009) e o fígado por ser responsável pelo catabolismo do mesmo (BRUSLÉ & ANADON, 1996).

A efetividade e segurança de um sedativo pode variar em função da composição e concentrações dos princípios ativos e outros metabólitos secundários da planta. Sua composição é influenciada pela região de cultivo, época de colheita e idade da planta (GOURINE et al., 2010; WANG et al., 2009). Cada OE apresenta um ou mais princípios ativos, que são compostos majoritários em sua composição (BADI et al., 2004) e cada um desencadeia efeitos fisiológicos distintos, positivos e/ou deletérios quando utilizados na sedação de peixes (BENOVIT et al., 2015). Apesar da vasta literatura atestando a segurança do uso de OE como sedativos, alguns estudos apresentaram resultados adversos por causar distúrbios osmóticos (SINK & NEAL, 2009), além de desencadear respostas de estresse e estresse oxidativo (KING et al., 2005; PARK et al., 2008; PARK et al., 2009).

O óleo de cravo-da-índia é o anestésico a base de plantas mais estudado e mais utilizado na aquicultura (SOTO & BURHANUDDIN, 1995; JAVAHERY, NEKOUBIN & MORADLU, 2012; BOWKER et al., 2015) e possui como principal princípio ativo o eugenol, que corresponde a mais de 60% de sua constituição (YANISSE et al., 2020). Sua eficácia como anestésico já foi comprovada em várias espécies de peixes como *Oncorhynchus mykiss* (KEENE et al., 1998; VELÍŠEK et al., 2005), *Cyprinus carpio* (HUSEN & SHARMA, 2015), *Colossoma macropomum* (CARNEIRO et al., 2019), *Oreochromis niloticus* (SIMÕES et al., 2011), *Danio rerio* (GRUSH et al., 2004), *Carassius auratus* (PERDIKARIS et al., 2010), entre outras espécies (AYDIN & BARBAS, 2020). O uso do óleo de cravo tem sido considerado seguro por apresentar baixa toxicidade (MITJANA et al., 2014) e ser rapidamente degradado no ambiente (AYDIN et al., 2019), entretanto, existem indícios que o mesmo pode causar danos

oxidativos e desencadear respostas de estresse em algumas espécies de peixes (AFIFI, AL-THOBAITI & RASEM, 2000; VELISEK et al., 2011). Portanto, são necessários estudos para avaliar a segurança de seu uso em diferentes espécies e condições ambientais de temperatura, pH, salinidade, bem como avaliar em diferentes tempos de exposição e recuperação.

Para o comércio de peixes ornamentais, a capacidade de recuperação do estresse proveniente do transporte é importante para a atratividade do mesmo em termos de coloração, comportamento saudável, bem como integridade de pele e nadadeiras (PARIPATANANONT et al., 1999; GOUVEIA et al., 2003). Deste modo, se faz necessária a avaliação das respostas de estresse e do status redox dos peixes não só logo após o transporte, mas também após um período de dias, afim de avaliar sua capacidade de recuperação após o transporte sob sedação.

A maioria dos estudos que avaliam sedativos naturais durante o transporte de peixes utilizam o extrato bruto de uma planta (folhas, frutos, raízes ou rizomas) ou um de seus principais princípios ativos (HOSEINI, MIRGHAED, & YOUSEFI, 2019). Contudo, o uso combinado de diferentes aditivos, com propriedades distintas ainda é pouco comum. Considerando que diferentes aditivos podem apresentar efeitos complementares, sinérgicos ou antagônicos, se faz necessário avaliar diferentes combinações de aditivos que tenham eficácia comprovada em peixes. Deste modo, com o presente estudo, objetivamos avaliar o uso concomitante dos principais aditivos utilizados durante o transporte de peixes: o sal comum e o óleo de cravo.

1. Referências bibliográficas

- ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. (2018). **Mercado Pet Brasil 2021**. São Paulo/SP. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/mercado/>>. Acesso em, 27/04/2020.
- AFIFI, S. H., AL-THOBAITI, S. & RASEM, B. M. (2000). Multiple exposure of Asian sea bass, (*Lates calcarifer*, Centropomidae) to clove oil: a histopathological study. **Assiut Vet Med J**, 42(84), 166-174. Doi: 10.21608/AVMJ.2000.180482
- AYDIN, B. & BARBAS, L. A. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. **Aquaculture**, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>
- AYDIN, B., AKHAN, S., GÜMÜŞ, E. & ÖZBAŞ, M. (2019). Anesthetic efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol on doctor fish, *Garra rufa* (Heckel, 1843). **Bol Inst Pesca**, 45(4). <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.4.506>
- BADI, H. N., YAZDANI, D., ALI, S. M. & NAZARI, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Ind Crops Prod**, 19(3), 231-236. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.005>
- BARCELLOS, L. J., KREUTZ, L. C. & QUEVEDO, R. M. (2006). Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, 253(1-4), 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.035>
- BARTON, B. A. & IWAMA, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annu Rev Fish Dis**, 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- BARTON, B. A. & PETER, R. E. (1982). Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. **J Fish Biol**, 20(1), 39-51. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb03893.x>
- BARTON, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integr Comp Biol**, 42(3), 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- BECKER, A. G., LUZ, R. K., MATTIOLI, C. C., NAKAYAMA, C. L., E SILVA, W. D., LEME, F. D., DE MENDONÇA MENDES, H., HEINZMANN, B. M. & BALDISSEROTTO, B. (2017). Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri* after transport? **Aquaculture**, 481, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007>
- BENOVIT, S. C., GRESSLER, L. T., DE LIMA SILVA, L., DE OLIVEIRA GARCIA, L., OKAMOTO, M. H., DOS SANTOS PEDRON, J., SAMPAIO, L. A., RODRIGUES, R. V., HEINZMANN, B. M. & BALDISSEROTTO, B. (2012). Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **J World Aquac Soc**, 43(6), 896-900. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00604.x>

- BENOVIT, S. C., SILVA, L. L., SALBEGO, J., LORO, V. L., MALLMANN, C. A., BALDISSEROTTO, B., FLORES, E. M. & HEINZMANN, B. M. (2015). Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. **An Acad Bras Cienc**, 87(3), 1675-1689. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140223>
- BERG, J. M. & LUBERT, J. (2008), **Bioquímica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p.
- BERKA, R. (1986). The transport of live fish: a review (Vol. 48). Rome: **FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations**.
- BIDHAN C. D., MEENA, D. K., BEHERA, B. K., DAS, P., MOHAPATRA, P. D. & SHARMA, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiol Biochem**, 40(3), 921-971. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9897-0>
- BOAVENTURA, T. P., PEDRAS, P. P., JÚLIO, G. S., DOS SANTOS, F. A., FERREIRA, A. L., DE SOUZA E SILVA, W. & LUZ, R. K. (2021). Use of eugenol, benzocaine or salt during the transport of panga, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878): Effects on water quality, haematology and blood biochemistry. **Aquac Res**. 53(4), 1395-1403. <https://doi.org/10.1111/are.15672>
- BOWKER, J. D., TRUSHENSKI, J. T., GLOVER, D. C., CARTY, D. G. & WANDELEAR, N. (2015). Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. **Rev Fish Biol Fish**, 25(1), 147-163. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9374-6>
- BRANDÃO, F. R., GOMES, L. D. & CHAGAS, E. C. (2006). Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazon**, 36, 349-356. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672006000300010>
- BRANDÃO, F. R., GOMES, L. D., CRESCÊNCIO, R. & CARVALHO, E. D. (2008). Use of salt during the transportation of pirarucu juveniles (1kg) (*Arapaima gigas*). **Acta Amazon**, 38(4), 767-771. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400022>
- BRAUN, N. & NUÑER, A. P. (2014). Stress in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) at different densities and times in a simulated transport. **Zoologia (Curitiba)**, 31(1), 101-104. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702014000100012>
- BRUSLÉ, J. & ANADON, G. G. (1996). The structure and function of fish liver. **Fish morphology** (pp. 77-93). Routledge.
- CAN, E. & SÜMER, E. (2019). Anesthetic and sedative efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils in blue dolphin cichlid (*Cyrtocara moorii*). **Turk J Vet Anim Sci**, 43(3), 334-341. Doi: 10.3906/vet-1809-22
- CÁRDENAS, C., TONI, C., MARTOS-SITCHA, J. A., CÁRDENAS, S., DE LAS HERAS, V., BALDISSEROTTO, B., HEINZMANN, B. M., VÁZQUEZ, R. & MANCERA, J. M. (2016). Effects of clove oil, essential oil of *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). **J Appl Ichthyol**, 32(4), 693-700. <https://doi.org/10.1111/jai.13048>

- CARNEIRO, P. C. & URBINATI, E. C. (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquac Res**, 32(4), 297-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00558.x>
- CARNEIRO, P. C. & URBINATI, E. C. (2002). Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquac Int**, 10(3), 221-229. <https://doi.org/10.1023/A:1022166411089>
- CARNEIRO, W. F., MELO, N., DA SILVA, K. C., FERREIRA, I. S., PAULA, D. A., FERRANTE, M. & MURGAS, L. D. (2019). Clove oil as anesthetic for tambacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). **Adv Anim Vet Sci**, 7(11), 969-976. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.11.969.976>
- CHENG C. H., LIANG H. Y., LUO S. W., WANG A. L. & YE C. X. (2018). The protective effects of vitamin C on apoptosis, DNA damage and proteome of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. **J Therm Biol**. 71:128–135. <https://doi:10.1016/j.jtherbio.2017.11.004>
- CHOWDHURY, S. & SAIKIA, S. K. (2020). Oxidative stress in fish: a review. **J. Sci. Res.**, 12(1), 145-160. <https://doi.org/10.3329/jsr.v12i1.41716>
- CORREIA, A. M., PEDRAZZANI, A. S., MENDONÇA, R. C., MASSUCATTO, A., OZÓRIO, R. A. & TSUZUKI, M. Y. (2017). Basil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830). **Braz J Biol**, 78, 436-442. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166695>
- COSTA, S. M., LEMOS, T. L., PESSOA, O. D., ASSUNÇÃO, J. C. & BRAZ-FILHO, R. (2002). Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Rev Bras Farmacogn**, 12, 66-67. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300032>
- CROSBY, T. C., HILL, J. E., WATSON, C. A., YANONG, R. P. & STRANGE, R. (2006). Effects of tricaine methanesulfonate, hypno, metomidate, quinaldine, and salt on plasma cortisol levels following acute stress in threespot gourami *Trichogaster trichopterus*. **J Aquat Anim Health**, 18(1), 58-63. <https://doi.org/10.1577/H05-026.1>
- CUNHA, J. A., SCHEEREN, C. Á., SALBEGO, J., GRESSLER, L. T., MADALOZ, L. M., BANDEIRA-JUNIOR, G., BIANCHINI, A. E., PINHEIRO, C. G., BORDIGNON, S. A., HEINZMANN, B. M. & BALDISSEROTTO, B. (2017). Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. **Neotrop Ichthyol**, 15. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160076>
- DA CUNHA, M. A., DE BARROS, F. M., DE OLIVEIRA GARCIA, L., DE LIMA VEECK, A. P., HEINZMANN, B. M., LORO, V. L., EMANUELLI, T. & BALDISSEROTTO, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 306(1-4), 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- DAVIS, K.B. (2006) Management of physiological stress in finfish aquaculture. **N Am J Aquac**, 68, 116–121. Doi: 10.1577/A05-007.1
- DE CARBALHO GOMES, L., ROUBACH, R. & ARAUJO-LIMA, C. A. (2002). Transportation of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*) in Amazon: main problems.

World Aquaculture. Baton Rouge, 33(1), 51-54. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000300015>

FAVERO, G. C., E SILVA, W. D., BOAVENTURA, T. P., LEME, F. D. & LUZ, R. K. (2019). Eugenol or salt to mitigate stress during the transport of juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a Neotropical carnivorous freshwater catfish. **Aquaculture**, 512, 734321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734321>

FERREIRA, A. L. & MATSUBARA, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** 1997, 43(1), 61-68. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

FRANCIS-FLOYD, R. (2002). Stress – Its Role in Fish Disease. In: **IFAS Extension Circular 919**, 2002, University of Florida, Gainesville.

GILDBERG, A., MIKKELSEN, H., SANDAKER, E. & RINGØ, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, 352(1-3), 279-285. <https://doi.org/10.1023/A:1003052111938>

GOLOMBIESKI, J. I., SILVA, L. V., BALDISSEROTTO, B. & DA SILVA, J. H. (2003). Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture**, 216(1-4), 95-102. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00256-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00256-9)

GOMES, L. D. (2003a). Protocolo para o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*) vivo. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, Documentos; 27 (INFOTECA-E).

GOMES, L. D., ARAUJO-LIMA, C. A., ROUBACH, R. & URBINATI, E. C. (2003b). Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesqui Agropecu Bras**, 38(2), 283-290. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000200016>

GOMES, L. D., CHAGAS, E. C., BRINN, R. P., ROUBACH, R., COPPATI, C. E. & BALDISSEROTTO, B. (2006). Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, 256(1-4), 521-528. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.004>

GOURINE, N., YOUSFI, M., BOMBARDA, I., NADJEMI, B. & GAYDOU, E. (2010). Seasonal variation of chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. **J Am Oil Chem Soc**, 87(2), 157-166. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1481-5>

GOUVEIA, L., REMA, P., PEREIRA, O. & EMPIS, J. (2003). Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. **Aquac Nutr**, 9(2), 123-129. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00233.x>

GRESSLER, L. T., RIFFEL, A. P., PARODI, T. V., SACCOL, E. M., KOAKOSKI, G., DA COSTA, S. T., PAVANATO, M. A., HEINZMANN, B. M., CARON, B., SCHMIDT, D., LLESUY, S. F., BARCELLOS, L. J. & BALDISSEROTTO, B. (2014). Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquac Res**, 45(6), 1061-1072. <https://doi.org/10.1111/are.12043>

GRUSH, J., NOAKES, D. L. & MOCCIA, R. D. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, 1(1), 46-53. <https://doi.org/10.1089/154585404774101671>

HAJEK, G. J. (2011). The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquac Res**, 42(2), 296-300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02625.x>

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. **Oxford university press**, USA.

HANNAN, K. D. & RUMMER, J. L. (2018). Aquatic acidification: a mechanism underpinning maintained oxygen transport and performance in fish experiencing elevated carbon dioxide conditions. **J Exp Biol**, 221(5), jeb154559. <https://doi.org/10.1242/jeb.154559>

HARMON, T. S., (2009). Methods for reducing stress and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Rev Aquac** 1, 58–66. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>

HISANO, H., ISHIKAWA, M. M., DE ÁVILA FERREIRA, R., BULGARELLI, A. L., COSTA, T. R. & DE PÁDUA, S. B. (2008). Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. **Acta Sci Biol Sci**, 30(3), 303-307. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v30i3.485>

HOSEINI, S. M. (2011). Efficacy of clove powder solution on stress mitigation in juvenile common carps, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Comp Clin Path**, 20(4), 359-362. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1002-9>

HOSEINI, S. M., TAHERI MIRGHAED, A. & YOUSEFI, M. (2019). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Rev Aquac**, 11(3), 550-564. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>

HOSSAIN M. S., KOSHIO S., ISHIKAWA M., YOKOYAMA S., SONY N. M., DOSSOU S. & WANG W. (2018). Influence of dietary inosine and vitamin C supplementation on growth, blood chemistry, oxidative stress, innate and adaptive immune responses of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. **Fish Shellfish Immunol**. 82:92–100. <https://doi:10.1016/j.fsi.2018.08.014>

HUSEN, M. A. & SHARMA, S. (2015). Anaesthetics Efficacy of MS-222, Benzoak® vet, AQUI-S® and Clove oil on common carp (*Cyprinus carpio*) fry. **Int J Res Fish Aquac**, 5, 104-114. <https://doi.org/10.1111/are.12698>

IGE, B. A. (2013). Probiotics use in intensive fish farming. **Afr J Microbiol Res**, 7(22), 2701-2711. DOI: 10.5897/AJMRx12.021

INOUE, L. A., SANTOS NETO, C. D. & MORAES, G. (2003). Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Cienc Rural**, 33(5), 943-947. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>

IWAMA, G. K. (1998). Stress in fish. **Ann N Y Acad Sci**, 851(1), 304-310. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x

JAVAHERY, S., NEKOUBIN, H. & MORADLU, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish. **Fish Physiol Biochem**, 38(6), 1545-1552. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>

JAWORSKI, A. O mercado de aquarismo nos tempos de pandemia: depoimento. [11/05/2021]. **Revista Negócios Pet**. Entrevista concedida a Mirela Luiz. Disponível em: <<https://rnpet.com.br/uncategorized/o-mercado-de-aquarismo-nos-tempos-de-pandemia/>> Acesso em: 12/01/2022

KEENE, J. L., NOAKES, D. L., MOCCIA, R. D. & SOTO, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquac Res**, 29(2), 89-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>

KING, W., HOOPER, B., HILLSGROVE, S., BENTON, C., & BERLINSKY, D. L. (2005). The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquac Res**, 36(14), 1442-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x>

KOURY, J. C. & DONANGELO, C. M., 2003. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev de Nutr**. 16(4), 433-441. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>

LIVINGSTONE, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. **Rev Med Vet (Toulouse)**, 154(6), 427-430.

LUSHCHAK, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat toxicol**, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

MARKING, L. L. & MEYER, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, 10(6), 2-5. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1985\)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1985)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2)

MAZIK, P. M., SIMCO, B. A. & PARKER, N. C. (1991). Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. **Trans Am Fish Soc**, 120(1), 121-126. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1991\)120<0121:IOWHAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1991)120<0121:IOWHAS>2.3.CO;2)

MCDONALD, G. & MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K. et al. (org) **Fish stress and health in aquaculture**, Cambridge, Reino Unido. Cambridge University Press 62, 119-145, 290p.

METIN, S., DIDINEN, B. I., KUBILAY, A., PALA, M. & AKER, İ. (2015). Determination of anesthetic effects of some medicinal plants on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). **AGRIS** - International Information System for the Agricultural Sciences and Technology (FAO). Doi:10.17216/LimnoFish-5000099756

MIFSUD, C. & ROWLAND, S. J. (2008). Use of salt to control ichthyophthiriosis and prevent saprolegniosis in silver perch, *Bidyanus bidyanus*. **Aquac Res**, 39(11), 1175-1180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01981.x>

MIRGHAED, A. T. & GHELICHPOUR, M. (2019). Effects of anesthesia and salt treatment on stress responses, and immunological and hydromineral characteristics of common carp

(*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) subjected to transportation. **Aquaculture**, 501, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.008>

MIRGHAED, A. T., GHELICHPOUR, M. & HOSEINI, S. M. (2016). Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. **Aquaculture**, 464, 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.028>

MITJANA, O., BONASTRE, C., INSUA, D., FALCETO, M. V., ESTEBAN, J., JOSA, A. & ESPINOSA, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, 433, 491-495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.013>

MOHAPATRA, S., CHAKRABORTY, T., KUMAR, V., DEBOECK, G. & MOHANTA, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, 97(3), 405-430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>

MOREIRA, A. G., TEIXEIRA, E. G., CARREIRO, C. R. & MOREIRA, R. L. (2010). Eficácia do eugenol extraído da planta *Eugenia aromatica* como anestésico para realização de biometrias em adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Sci**, 32(4), 419-423. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i4.9973>

NEIFFER, D. L. & STAMPER, M. A. (2009). Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J**, 50(4), 343-360. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>

NOORI, S. (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. **Open access Sci Rep**, 1(8), 1-9. Doi:10.4172/scientificreports.413

PARIPATANANONT, T., TANGTRONGPAIROJ, J., SAILASUTA, A. & CHANSUE, N. (1999). Effect of astaxanthin on the pigmentation of goldfish *Carassius auratus*. **J World Aquac Soc**, 30(4), 454-460. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00993.x>

PARK, M. O., HUR, W. J., IM, S. Y., SEOL, D. W., LEE, J. & PARK, I. S. (2008). Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquac Res**, 39(8), 877-884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>

PARK, M. O., IM, S. Y., SEOL, D. W. & PARK, I. S. (2009). Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, 287(3-4), 427-430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.049>

PARODI, T. V., CUNHA, M. A., BECKER, A. G., ZEPPEFELD, C. C., MARTINS, D. I., KOAKOSKI, G., BARCELLOS, L. G., HEINZMANN, B. M. & BALDISSEROTTO, B. (2014). Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol Biochem**, 40(2), 323-334. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9845-z>

PERDIKARIS, C., NATHANAILIDES, C., GOUVA, E., GABRIEL, U. U., BITCHAVA, K., ATHANASOPOULOU, F., PASCHOU, A. & PASCHOS, I. (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). **Acta Vet Brno**, 79(3), 481-490. <https://doi.org/10.2754/avb201079030481>

- PEREIRA, R. J. & DAS GRAÇAS CARDOSO, M. (2012). Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **J. Biotechnol. Biodivers.**, 3(4).
- PORTZ, D. E., WOODLEY, C. M. & CECH, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. **Rev Fish Biol Fish**, 16(2), 125-170. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>
- PRAMOD, P. K., RAMACHANDRAN, A., SAJEEVAN, T. P., THAMPY, S. & PAI, S. S. (2010). Comparative efficacy of MS-222 and benzocaine as anaesthetics under simulated transport conditions of a tropical ornamental fish *Puntius filamentosus* (Valenciennes). **Aquac Res**, 41(2), 309-314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02333.x>
- PRIBORSKY, J. & VELISEK, J. (2018). A review of three commonly used fish anesthetics. **Rev. Fish. Sci. Aquac.**, 26(4), 417-442. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1442812>
- RANDALL, D. J. & TSUI, T. K. (2002). Ammonia toxicity in fish. **Mar Pollut Bull**, 45(1-12), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- RANDALL, D.J. AND LIN, H. (1993). Effects of Variations in Water pH on Fish. In **Aquaculture: Fundamental and Applied Research** (eds B. Lahlou and P. Vitiello) 43(3).
- SACCOL, E. M., TONI, C., PÊS, T. S., OURIQUE, G. M., GRESSLER, L. T., SILVA, L. V., MOURÃO, R. H., OLIVEIRA, R. B., BALDISSEROTTO, B. & PAVANATO, M. A. (2017). Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquac Res**, 48(5), 2012-2031. <https://doi.org/10.1111/are.13034>
- SALARO, A. L., CAMPELO, D. A., TAVARES, M. M., BRAGA, L. G., PONTES, M. D. & ZUANON, J. A. (2015). Transport of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 in saline water. **Acta Sci Biol Sci**, 37(2), 137-142. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i2.26884>
- SAMPAIO, F. D. & FREIRE, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish Fish (Oxf)**, 17(4), 1055-1072. <https://doi.org/10.1111/faf.12158>
- SCHNEIDER, C. D. & OLIVEIRA, A. R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, 10(4), 308-313. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>
- SILVA, L. D., GARLET, Q. I., KOAKOSKI, G., ABREU, M. S., MALLMANN, C. A., BALDISSEROTTO, B., BARCELLOS, L. J. & HEINZMANN, B. M. (2015). Anesthetic activity of the essential oil of *Ocimum americanum* in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and its effects on stress parameters. **Neotrop Ichthyol**, 13, 715-722. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150012>
- SIMÕES, L. N., LOMBARDI, D. C., GOMIDE, A. & GOMES, L. C. (2011). Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. **Zoologia (Curitiba)**, 28(3), 285-290. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702011000300001>

- SINK, T. D. & NEAL, J. W. (2009). Stress response and posttransport survival of hybrid striped bass transported with or without clove oil. **N Am J Aquac**, 71(3), 267-275. <https://doi.org/10.1577/A08-040.1>
- SOLTANI, M., GHAFARI, M., KHAZRAEINIA, P. & BOKAEI, S. (2004). Effects of Clove oil (*Eugenia caryophyllata*) anesthesia on haematological parameters, certain serum enzymes and some tissues in common carp (*Cyprinus carpio*). **J Vet Res** 59(3), 295-299. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=23910>
- SOTO, C. G. & BURHANUDDIN, S. (1995) Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture**, 136:149–152. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01051-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01051-3)
- STIEGLITZ, J. D., BENETTI, D. D. & SERAFY, J. E. (2012) Optimizing transport of live juvenile coibia (*Rachycentron canadum*): effects of salinity and shipping biomass. **Aquaculture**, 364–365, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.038>
- STOSKOPF, M. & POSNER, L. P. (2008). Anesthesia and restraint of laboratory fish. In: **Anesthesia and analgesia in laboratory animals** (pp. 519-534). Academic Press.
- TACCHI, L., LOWREY, L., MUSHARRAFIEH, R., CROSSEY, K., LARRAGOITE, E. T. & SALINAS, I. (2015). Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 435, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.027>
- TEIXEIRA, R. R., DE SOUZA, R. C., SENA, A. C., BALDISSEROTTO, B., HEINZMANN, B. M., COUTO, R. D. & COPATTI, C. E. (2017). Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. **Aquac Res**, 48(7), 3383-3392. <https://doi.org/10.1111/are.13165>
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M. & SCOULLOS, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol Environ Saf**, 64(2), 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- VAN DER BOON, J., VAN DEN THILLART, G. E. & ADDINK, A. D. (1991). The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. **Comp Biochem Physiol A Physiol**, 100(1), 47-53. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90182-C](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90182-C)
- VANDERZWALMEN, M., EATON, L., MULLEN, C., HENRIQUEZ, F., CAREY, P., SNELLGROVE, D. & SLOMAN, K. A. (2019). The use of feed and water additives for live fish transport. **Rev Aquac**, 11(1), 263-278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>
- VANDERZWALMEN, M., MCNEILL, J., DELIEUVIN, D., SENES, S., SANCHEZ-LACALLE, D., MULLEN, C., MCLELLAN, I., CAREY, P., SNELLGROVE, D., FOGGO, A., ALEXANDER, M. E., HENRIQUEZ, F. L., SLOMANA, K. A. & SLOMAN, K. A. (2021). Monitoring water quality changes and ornamental fish behaviour during commercial transport. **Aquaculture**, 531, 735860. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735860>
- VASCONCELOS, S. M., GOULART, M. O., MOURA, J. B., MANFREDINI, V., BENFATO, M. D. & KUBOTA, L. T. (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua

determinação. **Quim nova**, 30(5), 1323-1338. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>

VELÍŠEK, J., STARA, A., LI, Z. H., SILOVSKA, S. & TUREK, J. (2011). Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, 310(3-4), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>

VELÍŠEK, J., SVOBODOVA, Z. & PIAČKOVÁ, V. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Vet Brno**, 74(1), 139-146. <https://doi.org/10.2754/avb200574010139>

WANG, L. M., LI, M. T., JIN, W. W., LI, S., ZHANG, S. Q. & YU, L. J. (2009). Variations in the components of *Osmanthus fragrans* Lour. essential oil at different stages of flowering. **Food Chem**, 114(1), 233-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.044>

WEERAKOON, D. E. & WEERAKOON, D. E. (2020). Strengthening, empowering and sustaining associations of small-scale aquaculture farmers with special focus on ornamental fish farmers associations in Sri Lanka. In: **Strengthening, empowering and sustaining small-scale aquaculture farmers' associations**, 655, 97.

WENDELAAR BONGA, S. E. (1997). The stress response in fish. **Physiol rev**, 77(3), 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>

WILKIE, M. P. (1997). Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comp Biochem Physiol A Physiol**, 118(1), 39-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00407-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00407-0)

YANISSE, S., BENHHADOU, H., KARBANE, M. E., MOJEMMI, B., TLIGUI, H. & BOUATIA, M. (2020). Determination of chemical composition and evaluation of Antioxidant, and Antimicrobial activities of Clove Oil obtained from *Syzygium Aromaticum* Moroccan species. **Int J Pharm Sci Res**, 11(2), 2568-2574. Doi: 10.26452/ijrps.v11i2.2261

YOUNG, T., WALKER, S. P., ALFARO, A. C., FLETCHER, L. M., MURRAY, J. S., LULIJWA, R. & SYMONDS, J. (2019). Impact of acute handling stress, anaesthesia, and euthanasia on fish plasma biochemistry: implications for veterinary screening and metabolomic sampling. **Fish Physiol Biochem**, 45(4), 1485-1494. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00669-8>

CAPÍTULO 2

Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal comum no transporte de longa duração de *Cyprinus carpio*

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

1 Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal comum no transporte de longa
2 duração de *Cyprinus carpio*

3 RESUMO

4 Com o presente estudo objetivamos avaliar a eficácia e segurança do óleo de cravo (OEC) em
5 associação com o sal comum durante o transporte de longa duração (24h) de *Cyprinus carpio*.
6 Foram realizados dois experimentos em esquema fatorial 4x2, em DIC, com um tratamento
7 adicional (antes do transporte) sendo quatro níveis de OEC 0; 5; 10 e 15 mg L⁻¹, dois níveis sal
8 0 e 3 g L⁻¹ e três repetições, diferente apenas quanto ao momento da coleta de amostras (logo
9 após ou 96h após o transporte). Em geral, os resultados observados permitem concluir que a
10 utilização de OEC isoladamente não é segura para o transporte de carpas por causar aumento
11 na amônia não ionizada na água e desencadear estresse oxidativo nas brânquias e fígado. Apesar
12 da utilização do sal comum ter proporcionado redução no teor de amônia na água e nas respostas
13 de estresse (glicose), sua utilização isolada também não é recomendada, uma vez que este
14 causou danos oxidativos no fígado e nas brânquias, efeitos ainda não relatados na literatura.
15 Entretanto, a utilização do sal em associação com 5 mg L⁻¹ OEC proporcionou os melhores
16 resultados tanto logo após, como 96 h após o transporte. Nas brânquias, houve redução de óxido
17 nítrico (ON) e proteínas carboniladas (PC) e aumento na atividade da enzima catalase (CAT)
18 após 96 h, enquanto no fígado, logo após o transporte, houve redução de ON e dos danos
19 oxidativos (PC e malondialdeído - MDA), ao passo que 96 h após o transporte, houve redução
20 de ON e aumento na atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST). Deste modo, a
21 utilização destes aditivos em associação (5 mg L⁻¹ de OEC + 3 g L⁻¹ de sal comum) se mostrou
22 eficaz e segura, pois proporcionou melhor manutenção da qualidade da água (menor teor de
23 amônia) e manutenção do status redox nas brânquias e no fígado de *C. carpio* submetidos ao
24 transporte de longa duração.

25 Palavras-chave: Antioxidantes; cloreto de sódio; extratos vegetais; peixes ornamentais;
26 sedação.

27 **1. Introdução**

28 O transporte é frequentemente realizado durante a criação e comercialização de peixes,
29 porém, é um dos procedimentos que mais acarretam estresse (MEINELT et al., 2008; PORTZ
30 et al., 2006) em função dos manejos de captura, confinamento, adensamento e alterações na
31 qualidade da água (CARNEIRO & URBINATI, 2002), particularmente no transporte de longa
32 duração (acima de 8 h). Nestas condições, as principais respostas de estresse desencadeadas são
33 o aumento da ventilação branquial (OBA et al., 2009) que pode levar a distúrbios osmóticos
34 (YARAHMADI et al., 2016) e estresse oxidativo (PAN et al., 2010); o aumento do metabolismo
35 (SLOMAN et al., 2000) que leva à maior excreção de CO₂ e consequente redução do pH da
36 água (HARMON, 2009) e a mobilização das reservas energéticas (OBA et al., 2009) que pode
37 levar a maior excreção de amônia (RANDALL & WRIGHT, 1989). Além disso, os peixes
38 podem perder o muco protetor que recobre sua superfície corporal devido ao adensamento
39 (VANDERZWALMEN et al., 2019), o que resulta em injúrias na pele, perda de escamas, maior
40 suscetibilidade a doenças e consequentemente aumento de mortalidade (WEDEMEYER,
41 1996).

42 Com o intuito de minimizar os efeitos adversos do transporte, podem ser utilizados
43 aditivos na água, como sedativos e o sal comum (VANDERZWALMEN et al., 2019). Os
44 sedativos são utilizados com o objetivo de reduzir as respostas de estresse e o metabolismo dos
45 peixes, e assim, diminuir o consumo de oxigênio, a produção de CO₂ e a excreção de amônia
46 na água (HARMON, 2009). Alguns sedativos, como os óleos essenciais, também apresentam
47 propriedades antioxidante, antimicrobiana, imuno estimulante e miorrelaxante (COSTA et al.,
48 2002; DA CUNHA et al., 2010; FUJIMOTO et al., 2018; SACCOL et al., 2017). O sal comum
49 é utilizado por diminuir o gradiente osmótico entre o ambiente externo (água doce) e o plasma,
50 com redução dos distúrbios osmóticos; por estimular a produção de muco, que melhora a
51 proteção contra injúrias mecânicas e microbiológicas, e assim prevenir doenças (GOMES et al.,

52 2003; MIFSUD & ROWLAND, 2008), bem como mitigar as respostas de estresse
53 (MIRGHAED & GHELICHPOUR, 2019). Porém, os efeitos do sal sobre as respostas de
54 estresse têm mostrado diferentes resultados em diferentes espécies, variando desde redução até
55 aumento das respostas de estresse, além de discrepâncias de resultados para a mesma espécie
56 (CARNEIRO & URBINATI, 2002; FAVERO et al., 2019; GOMES et al., 2003; MAZIK,
57 SIMCO & PARKER, 1991; MIRGHAED & GHELICHPOUR, 2019; SALARO et al., 2015).
58 Portanto, as respostas dos peixes de água doce à salinidade da água são espécie-específicas.
59 Além disso, até o momento ainda não foram avaliados os efeitos da adição de sal na água sobre
60 o status redox dos peixes de água doce.

61 Dentre os sedativos utilizados no transporte de peixes, o óleo de cravo-da-índia (OEC),
62 *Syzygium aromaticum* L. (HOSEINI et al., 2018) destaca-se por ser de baixo custo, de fácil
63 obtenção (MITJANA et al., 2014) e eficaz para muitas espécies como *Cyprinus carpio* (HAJEK
64 et al., 2006), *Carassius auratus* (PERDIKARIS et al., 2010), *Danio rerio* (GRUSH et al., 2004),
65 dentre outras (JAVAHERY, NEKOUBIN & MORADLU, 2012). Apesar de reduzir respostas
66 de estresse durante sedação em *Brycon cephalus* (INOUE et al., 2005), *Salmo salar* L.
67 (IVERSEN et al., 2003) e *Oncorhynchus mykiss* (WAGNER et al., 2003), o OEC aumentou as
68 respostas de estresse em *Centropristis striata* (KING et al., 2005), *Epinephelus bruneus* (PARK
69 et al., 2008) e *Oplegnathus fasciatus* (PARK et al., 2009) e desencadeou outros efeitos adversos
70 como necrose branquial, distúrbios osmorregulatórios e estresse oxidativo (AFIFI et al., 2000;
71 SINK & NEAL, 2009; VELISEK et al., 2011). Portanto, se faz necessário avaliar formas mais
72 seguras e eficazes para a utilização de OEC como sedativo no transporte de peixes. A utilização
73 do OEC em associação com outros aditivos pode contribuir para a obtenção de resultados mais
74 seguros em função da possibilidade de estes apresentarem efeitos sinérgicos, complementares
75 ou mitigadores de efeitos colaterais. Contudo, qualquer aditivo acrescentado na água de
76 transporte resulta em aumento dos custos e, por isso, o sal comum apresenta-se promissor para

77 tal propósito por ser de baixo custo, de fácil obtenção, de fácil utilização e com reduzido
78 impacto ambiental (SELOSSE & ROWLAND, 1990). Portanto, objetivamos avaliar a eficácia
79 e segurança do OEC e do sal comum, usados isoladamente e em associação, como aditivos na
80 água de transporte de longa duração de *Cyprinus carpio*, uma importante espécie ornamental,
81 comercializada em praticamente todo o mundo (ARIEL, 2005; DUAN et al., 2009; SINGH &
82 LAKRA, 2011).

83 2. Material e Métodos

84 Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da
85 Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), protocolo n° 054/2016 (Anexo I).

86 2.1. Animais e condições pré-experimentais

87 Juvenis de *Cyprinus carpio* ($9,26 \pm 2,04$ g) obtidos de uma piscicultura ornamental
88 localizada no município de Patrocínio do Muriaé, Minas Gerais (Piscicultura AQUACEL
89 PEIXES ORNAMENTAIS®) foram transferidos para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à
90 Piscicultura e mantidos para aclimatação por 15 dias em caixas plásticas de 250 L com filtro
91 biológico, aeração e aquecedores com termostato (25°C). Os peixes foram alimentados com
92 ração comercial (SOMA - TEC PEIXE 45) três vezes ao dia (Anexo II). Antes da realização do
93 transporte, os peixes foram submetidos a jejum de 12h.

94 2.1.1. Qualidade de água

95 Foram coletadas amostras de água antes do transporte para avaliação da temperatura e
96 oxigênio dissolvido, mediante oxímetro digital (YSI®– 550A), pH, mediante pH digital
97 (YUMP® – ph-618) e amônia total por kit colorimétrico (LabconTest® 224 – Amônia Tóxica).
98 A amônia não ionizada foi calculada com base na fórmula: Amônia não ionizada = amônia
99 total/ $(1+10^{((0,0902-pH) + (2730/(273,3+temperatura))))$) de acordo com Emerson et al. (1975).

100 2.1.2. Respostas de estresse

101 Para avaliar as respostas de estresse, foram mensurados a glicose e o lactato sanguíneos
102 de 12 peixes antes do transporte. O sangue foi coletado por meio de um corte no pedúnculo
103 caudal com bisturi e depositado em tiras reagentes do aparelho monitor digital para leitura de
104 glicose (Accu-Chek® Active Roche) e para leitura de lactato (Accutrend® Plus Roche).

105 2.1.3. Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes

106 As análises do status redox foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de
107 Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV. Amostras de fígado (100 mg) e

108 brânquias (150 mg) foram coletadas em 9 peixes. Os tecidos foram conservados em nitrogênio
109 líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C.

110 Amostras de fígado e de brânquias foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão fosfato
111 1 mmol L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 7,4, com homogeneizador de
112 tecidos (Omni Tissue Homogenizer -TH) e centrifugados a 1.200 rpm, a 4°C, por 10 minutos.
113 Com o sobrenadante foram realizadas as análises para mensurar a produção do óxido nítrico
114 (ON), o marcador da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), a atividade das enzimas
115 antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e
116 proteínas totais. Os péletes derivados do homogenato foram utilizados para análise das
117 proteínas carboniladas. Todas as análises foram realizadas em duplicatas através de
118 espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japan) ou leitora de microplacas (Thermo
119 Scientific, Waltham, MA, USA).

120 2.1.3.1. Óxido Nítrico

121 Para estimar a produção de ON pelo método descrito por GRIESS (1879), o nitrito foi
122 utilizado como o indicador de sua síntese. O nitrito é detectado pelo Reativo de Griess,
123 composto por 1% de sulfanilamida, 0,1% naftil-etileno-diaminae e 2,5% H₃PO₄. Com esse
124 propósito, 50 µL do sobrenadante foram acrescentados em microplacas com o mesmo volume
125 do Reativo de Griess e incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. Logo após, foi
126 realizada a leitura em um leitor de microplacas, a 570 nm e os resultados foram expressos em
127 µmol L⁻¹. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de ON foi mensurada
128 de acordo com uma curva padrão que utiliza concentrações conhecidas de nitrito de sódio
129 (NaNO₂).

130 2.1.3.2. Malondialdeído

131 O malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, foi mensurado de
132 acordo com BUEGE & AUST (1978). O composto da reação continha 0,2 mL de amostra e 0,4

133 mL de solução de ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,375%) e ácido clorídrico
134 (0,6%). O composto foi homogeneizado em vórtex e conservado em banho maria a 90°C por
135 40 minutos. Após cinco minutos no gelo, foi adicionado 0,6 mL de álcool butanol ao composto,
136 homogeneizado em vórtex por dois minutos e centrifugado por 10 min, a 3500 rpm a 25°C. O
137 sobrenadante foi empregado para determinar a concentração de MDA, em leitor de microplacas,
138 a 540 nm. A concentração de MDA foi estabelecida pela curva padrão de concentrações de 1,
139 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína.

140 2.1.3.3. *Proteínas carboniladas*

141 O teor de proteínas carboniladas, o principal marcador de danos em proteínas, foi
142 mensurado através da utilização do reagente 2, 4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), embasado nos
143 grupos carbonil que atuam com o DNPH (LEVINE et al., 1994). Os péletes foram precipitados
144 em solução tricloroacético (TCA) 10% gelado e a solução centrifugada a 3.000 rpm, por 10
145 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi desconsiderado e acrescentado ao precipitado 0,5mL de
146 solução DNPH 10 mmol L⁻¹ que foi diluído em ácido clorídrico (7%). A solução foi agitada em
147 vórtex e mantida em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. Logo após, foi
148 centrifugada a solução em 3.000 rpm, por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante retirado e
149 acrescentado 0,5 mL de TCA 10%. A solução foi centrifugada novamente e o sobrenadante
150 despejado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 ml de acetato de etila e etanol (1:1 v/v).
151 A cada lavagem, a solução foi homogeneizada, centrifugada e descartado o sobrenadante. Por
152 fim, foi adicionado 1 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) 6%, a solução foi novamente
153 homogeneizada e centrifugada a 6.000 rpm, por 10 minutos, à 15°C. Foi produzido um branco
154 para cada amostra, em que foi acrescentado 0,5 mL de solução de ácido clorídrico 7% ao
155 precipitado como substituto ao DNPH. O sobrenadante foi empregado para definir a
156 concentração da proteína carbonilada em leitor de microplacas à 370 nm e resultados foram
157 manifestados em nmol mL⁻¹.

2.1.3.4. *Atividade da enzima superóxido dismutase*

158
159 A atividade da SOD foi determinada através do poder desta enzima em catalisar a reação
160 do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e consequente diminuição da auto oxidação do pirogalol
161 (DIETERICH et al., 2000). Resumidamente, 99 μ L de tampão fosfato (5 mmol L⁻¹, pH 7,0) foi
162 acrescido a 6 μ L de solução MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H] -2,5-
163 difeniltetrazolium) (PM = 414,3) 1,25 mM e 30 μ L de amostra. Para começar a reação, foi
164 adicionado 15 μ L de pirogalol (100 μ mol L⁻¹) e a solução foi mantida incubada à 37 °C por
165 cinco minutos. Após esse período foi adicionado 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (PM=
166 78,13). A atividade da enzima antioxidante SOD foi expressa como unidade (U) por miligrama
167 de proteína, em que uma U de SOD foi considerada como a quantidade que impede a auto
168 oxidação do pirogalol em 50%, que foi determinada em leitor de microplacas à 570 nm. Com
169 esse intuito, a concentração das proteínas totais foi determinada conforme metodologia sugerida
170 por BRADFORD (1976), em leitor de microplacas à 570 nm. A atividade da SOD foi expressa
171 em U SOD mg⁻¹ de proteína.

2.1.3.5. *Atividade da enzima catalase*

172
173 A atividade da CAT foi contabilizada de acordo com HADWAN & ABED (2016) salvo
174 modificações. Uma alíquota de amostra (5 μ L) foi inserida a 100 μ L de substrato (65 mmol/mL
175 de H₂O₂ em 60 mmol/L de tampão fosfato de potássio e sódio), pH 7,4 ou em 100 μ L de tampão
176 (branco) e incubada a 37°C. Após três minutos, a reação foi parada com adição de 150 μ L de
177 molibdato e a análise da absorbância foi efetuada a 374 nm. Modificações na absorbância,
178 quanto ao branco, foram anotadas. A conversão da absorbância em concentrações micromolares
179 de H₂O₂ foi mensurada a partir de uma curva padrão de uma concentração conhecida de H₂O₂.
180 A atividade da catalase foi representada em U CAT mg⁻¹ de proteína.

2.1.3.6. Atividade da enzima glutationa S-transferase

181 A atividade da GST foi medida por meio da síntese do conjugado glutationa- 2,4-
182 dinitrobenzeno (CDNB) (HABIG, PABST & JAKOBY, 1974). A mistura da reação foi
183 composta por 970 μL de tampão fosfato (5 mmol L^{-1} , pH 7,0), 10 μL de 1-cloro-2,4-
184 dinitrobenzeno (CDNB) 1 mmol L^{-1} , 10 μL de glutationa reduzida (GSH) 1 mmol L^{-1} e 10 μL
185 da amostra. O branco recebeu todos os reagentes, exceto a amostra. A atividade da GST foi
186 mensurada em espectrofotômetro a 340 nm, durante 90 s, com intervalo de 30 s e expressa em
187 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.2. Transporte dos peixes

189 Foram realizados dois experimentos com o mesmo delineamento experimental,
190 diferindo apenas quanto ao tempo para a realização da coleta de amostras após o transporte,
191 sendo o primeiro experimento utilizado para análises logo após o transporte (Eficácia e
192 segurança do óleo de cravo e do sal comum no transporte de *C. carpio*), e o segundo, para
193 análises 96 h após o transporte (Efeitos do óleo de cravo e do sal comum sobre a recuperação
194 de *C. carpio* submetidos ao transporte), permitindo assim a avaliação da possibilidade de
195 recuperação dos peixes dos efeitos do transporte sobre as respostas de estresse e status redox.
196 Ambos foram realizados em esquema fatorial 4x2, em delineamento inteiramente casualizado
197 e um tratamento adicional (com três repetições, como referência às condições antes do
198 transporte). Foram avaliadas quatro concentrações de óleo de cravo-da-índia (OEC), *S.*
199 *aromaticum L.* (0; 5; 10 e 15 mg L^{-1}) e duas concentrações de sal comum (0 e 3 g L^{-1}), com três
200 repetições por tratamento. Cada saco plástico contendo 12 peixes foi considerado uma
201 repetição, totalizando 24 unidades experimentais em cada experimento. As concentrações de
202 OEC e sal comum utilizadas no presente estudo foram selecionadas com base nos resultados de
203 VELISEK et al. (2005) e MIRGHAED & GHELICHPOUR (2019), respectivamente.
204

205 Para obter as concentrações de OEC desejadas, foi preparada uma solução estoque em
 206 álcool etílico absoluto (1:10 v/v). Com base na densidade do OEC (985,6 mg mL⁻¹), foram
 207 calculados os volumes a serem utilizados para obtenção das concentrações de 5; 10 e 15 mg L⁻¹
 208 ¹, que correspondem a 4,425, 8,850 e 13,275 mg L⁻¹ de eugenol. O OEC utilizado apresentou,
 209 segundo cromatografia gasosa cedida pelo fabricante (LASZLO®) (Tabela 1).

210 **Tabela 1.** Composição química do óleo de cravo fornecida pelo fabricante (LASZLO®).

Constituinte	Concentração (%)
Eugenol	88,5
Cariofileno	8,6
Acetato de eugenila	1,7

211 Método de análise: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890. Coluna:
 212 BP1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 50°C (1min), 3°C /min, até 200°C. Injetor: 200°C Split: 1/50.
 213 Detector FID: 220°C. Volume de injeção: 1 ul (conc 1.0 % em clorofórmio). Picos menores que 0,1%
 214 foram excluídos.

215 **2.2.1. Condições experimentais durante o transporte**

216 Os peixes foram embalados em 48 sacos plásticos com dimensões de 40 x 60 cm (24
 217 para cada experimento), contendo 12 peixes por embalagem, com 2,5L de água, o que
 218 representou cerca de um terço do volume da embalagem mais cerca de 5L de oxigênio, o que
 219 representou cerca de dois terços do volume da embalagem (BERKA, 1986; GOMES, 2003a).
 220 Os sacos plásticos foram mantidos no porta-malas de um automóvel durante 24 h, alternando
 221 períodos em movimento e parado (FERREIRA et al., 2017). Após esse período, as embalagens
 222 foram transferidas para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura – Departamento de
 223 Biologia Animal – UFV. Os peixes provenientes de 24 sacos plásticos foram utilizados para
 224 coleta de amostras imediatamente após o transporte, e os peixes das demais 24 embalagens
 225 foram transferidos para aquários de 60L dotados de aeração, filtro biológico e temperatura

226 constante (25°C) e ao final de 96h após o transporte foram utilizados para a coleta de amostras.
227 Para a coleta das amostras, os peixes foram eutanasiados por secção medular seguida de
228 decapitação por meio da utilização de tesoura cirúrgica. A confirmação da morte foi realizada
229 por meio da ausência de resposta dos peixes mediante aplicação de estímulo mecânico com
230 bastão de vidro.

231 *2.2.1.1. Taxa de sobrevivência*

232 Para o avaliar o efeito do transporte, 24 embalagens foram utilizadas para mensurar taxa
233 de sobrevivência logo após o transporte, qualidade de água, respostas de estresse e status redox
234 dos peixes.

235 *2.2.1.2. Qualidade de água*

236 Foram coletadas amostras de água imediatamente após o transporte para a realização
237 das mesmas análises descritas nas condições pré-experimentais.

238 *2.2.1.3. Respostas de estresse*

239 Para avaliar as respostas de estresse imediatamente após o transporte, foram mensurados
240 a glicose e o lactato sanguíneos dos peixes da mesma forma descrita nas condições pré-
241 experimentais. Foram utilizados quatro peixes por repetição (12 peixes por tratamento).

242 *2.2.1.4. Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes*

243 Foram coletadas amostras de fígado (100 mg) e brânquias (150 mg) imediatamente após
244 o transporte de 3 peixes por repetição (9 peixes/tratamento). Foram realizadas as mesmas
245 análises descritas nas condições pré-experimentais.

246 **2.2.2. Condições experimentais durante a recuperação do transporte**

247 Imediatamente após o transporte, os peixes das demais 24 embalagens foram transferidos
248 para aquários de 60L dotados de filtro mecânico e biológicos, supridos com aeração por meio
249 de compressor de ar, mangueiras e pedras porosas.

250 2.2.2.1. *Taxa de sobrevivência*

251 Para avaliar a capacidade de recuperação do transporte, os peixes das demais
252 embalagens (24) foram soltos em aquários de 60L, e após 96 h, foi realizada nova contagem
253 para avaliar a taxa de sobrevivência, bem como análises de das respostas de estresse e status
254 redox.

255 2.2.2.2. *Respostas de estresse*

256 Para avaliar as respostas de estresse 96 h após o transporte, foram mensurados a glicose
257 e o lactato sanguíneos dos peixes da mesma forma descrita nas condições pré-experimentais.
258 Foram utilizados quatro peixes por repetição (12 peixes por tratamento).

259 2.2.2.3. *Marcadores oxidativos e enzimas antioxidantes*

260 Foram coletadas amostras de fígado (100 mg) e brânquias (150 mg) 96 h após o
261 transporte de 3 peixes por repetição (9 peixes/tratamento). Foram realizadas as mesmas análises
262 descritas nas condições pré-experimentais.

263 **2.3. Análises estatísticas**

264 Para avaliar o efeito do óleo de cravo-da-índia, do sal comum e suas interações, foi
265 realizada análise de variância de duas vias logo após o transporte e 96h após o transporte. Como
266 foi utilizado um esquema fatorial com tratamento adicional (antes do transporte), a análise
267 estatística foi complementada através da comparação do tratamento adicional com a média geral
268 do fatorial (após o transporte), e desdobramento da interação quando significativa. Para isso, o
269 teste de Duncan foi utilizado para comparação das médias. Os testes de Shapiro-Wilk e Levene
270 foram realizados para análise da distribuição normal dos resíduos e homogeneidade das
271 variâncias, respectivamente. Todas as análises foram realizadas no software livre R (R Core
272 Team, 2021), utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2021), considerando o nível de
273 5 % de probabilidade de cometer o erro tipo I.

274

275 3. Resultados

276 3.1. Efeitos do transporte

277 A comparação dos resultados obtidos imediatamente após o transporte com os valores
278 observados antes do transporte, permitiu demonstrar que independente dos tratamentos, o
279 transporte, em si, causou redução no pH e aumento na amônia não ionizada na água (Tabela 2);
280 diminuição de lactato sanguíneo (Tabela 3); aumento de óxido nítrico (ON), proteínas
281 carboniladas (PC) e a atividade da enzima GST, bem como redução da atividade das enzimas
282 SOD e CAT nas brânquias (Tabela 4). Além disso, foi observado no fígado aumento de ON e
283 malondialdeído (MDA) e redução na atividade da SOD (Tabela 5).

284 A comparação dos resultados obtidos 96 h após o transporte com os valores observados
285 antes do transporte, mostrou que a glicose aumentou e o lactato retornou aos valores antes do
286 transporte (Tabela 6). Além disso, ON e PC permaneceram mais altas que os valores antes do
287 transporte, bem como a redução na atividade da SOD nas brânquias (Tabela 7). No fígado, ON,
288 PC e MDA permaneceram mais altos do que antes do transporte. A atividade da SOD e CAT
289 permaneceram mais baixas, porém a atividade da GST foi maior que antes do transporte (Tabela
290 8). Para as demais variáveis analisadas não houve efeito do transporte. Não houve mortalidade
291 dos peixes tanto imediatamente, quanto 96 h após o transporte.

292 3.2. Eficácia e segurança do óleo de cravo e do sal comum após o transporte de *C.*

293 *carpio*

294 3.2.1. Qualidade de água logo após o transporte

295 No momento de coleta de água dos sacos plásticos, imediatamente após o transporte,
296 observamos temperatura média de $23,72 \pm 0,54$ °C. Para o pH e a amônia não ionizada (ANI),
297 houve interação significativa entre as concentrações de óleo de cravo (OEC) e o sal (Tabela 2).
298 Com relação ao efeito do OEC, na ausência de sal, não houve efeito significativo sobre o pH,
299 entretanto, na presença de sal, o OEC causou diminuição no pH da água (Tabela 2). Com relação
300 ao efeito do sal, o mesmo causou diminuição do pH, independente da concentração de OEC.
301 Na ausência de sal, o OEC causou aumento no teor de ANI nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹

302 ¹ de OEC, contudo, na presença de sal, não houve efeito significativo do OEC sobre a ANI
303 (Tabela 2). A adição de sal causou redução na excreção de amônia, independente da
304 concentração de OEC (Tabela 2).

305 Os valores de oxigênio dissolvido (OD) não foram considerados para análise estatística
306 devido ao aparelho utilizado não apresentar resultados confiáveis nos tratamentos com sal.
307 Entretanto, o OD foi maior que o controle positivo (antes do transporte) em todos os
308 tratamentos, uma vez que houve incremento de oxigênio nos sacos plásticos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios para as variáveis de qualidade da água logo após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g L ⁻¹)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	Antes do transporte vs transporte
pH	8,09	0	6,29 Aa	6,29 Aa	6,35 Aa	6,33 Aa	6,32	0,68	<0,01	0,43	<0,01	<0,01
		3	6,08 Ba	6,00 Bb	5,93 Bb	5,99 Bb	5,99					
		Média	6,18	6,15	6,14	6,16	6,16*					
OD (mg L ⁻¹)	7,47	0	22,85	23,53	23,02	22,46	22,96	0,19	-	-	-	-
		3	> 11,0	> 11,0	> 11,0	>11,0	>11,0					
		Média	22,85	23,53	23,02	22,46	22,96					
ANI (µg L ⁻¹)	0,00	0	3,43 Ac	3,57 Abc	4,23 Aa	3,97 Aab	3,80	10,47	<0,01	0,47	<0,01	<0,01
		3	2,10 Ba	1,80 Ba	1,57 Ba	1,80 Ba	1,80					
		Média	2,75	2,68	2,90	2,88	2,80*					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p-valor > $\alpha = 0,05$), pelo teste de Duncan e pelo teste F, respectivamente.

* Média do fatorial (imediatamente após o transporte) difere do valor antes do transporte, pelo teste F ao nível de 5% de significância.

251 **3.2.2. Respostas de estresse logo após o transporte**

252 Para a glicose sanguínea, não houve interação significativa entre as concentrações de
253 OEC e o sal comum (Tabela 3). O sal, independente das concentrações de OEC, reduziu o teor
254 de glicose sanguínea dos peixes imediatamente após o transporte (Tabela 3). Não houve efeito
255 significativo do OEC sobre o teor de glicose sanguínea (Tabela 3).

256 Para o lactato sanguíneo, não houve interação significativa entre o OEC e o sal, bem
257 como não houve efeito significativo do OEC e do sal isoladamente (Tabela 3).

258

Tabela 3. Valores médios para glicose e lactato sanguíneo de *C. carpio* logo após o transporte.

	Antes do Transporte	Sal Comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	Antes do transporte vs transporte
GLIC (mg dL ⁻¹)	45,83	0	57,28	55,58	53,75	60,00	56,65 A	14,70	0,04	0,12	0,13	0,13
		3	39,83	45,00	57,42	57,42	49,92 B					
		Média	48,56	50,29	55,58	58,71	53,28					
LACT (mg dL ⁻¹)	5,33	0	1,51	1,81	1,22	1,33	1,42	22,79	0,58	0,53	0,42	<0,01
		3	1,25	1,34	1,28	1,42	1,32					
		Média	1,38	1,57	1,25	1,28	1,37*					

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p-valor > $\alpha = 0,05$).

* Média do fatorial (imediatamente após o transporte) difere do valor antes do transporte pelo teste F ao nível de 5% de significância.

270 **3.2.3. Status redox nas brânquias logo após o transporte**

271 Não houve interação significativa entre OEO e sal comum para ON, PC, MDA, CAT e
272 GST (Tabela 4). As concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC causaram aumento dos níveis de
273 ON, quando comparadas com 0 e 5 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 4). Entretanto, o sal não apresentou
274 efeito significativo sobre o ON. O OEC causou aumento das PC apenas na concentração de 10
275 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 4). Não houve efeito significativo do sal sobre os níveis de PC (Tabela
276 4). O OEC causou aumento do MDA nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC, se
277 comparado a concentração de 0 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 4). Contudo, o tratamento 15 mg L⁻¹
278 não diferiu do 5 mg L⁻¹ e o 5 mg L⁻¹ não diferiu controle. Não houve efeito significativo do sal
279 sobre os níveis de MDA (Tabela 4).

280 Houve interação significativa entre o efeito do OEC e o sal para a atividade da SOD
281 (Tabela 4). Na ausência de sal, o OEC causou diminuição na atividade da SOD na concentração
282 de 5 mg L⁻¹ de OEC e aumento na atividade da SOD nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ de
283 OEC em relação ao 0 mg L⁻¹ (Tabela 4). Na presença de sal, o OEC causou aumento na
284 atividade da SOD apenas na concentração de 10 mg L⁻¹ de OEC em relação ao controle (Tabela
285 4). Com relação ao efeito do sal, o mesmo causou diminuição na atividade da SOD apenas na
286 concentração de 10 mg L⁻¹ de OEC em relação ao 10 mg L⁻¹ de OEC sem sal (Tabela 4). O sal
287 causou diminuição na atividade da CAT, independente das concentrações de OEC (Tabela 4).
288 O OEC causou aumento na atividade da GST em todas as concentrações de OEC avaliadas em
289 relação ao controle (Tabela 4). Além disso, nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC a
290 atividade da GST foi maior do que no tratamento 5 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios para as variáveis do status redox nas brânquias de *C. carpio* logo após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	Antes do transporte vs transporte
ON	11,01	0	11,36	12,20	16,09	13,67	13,33	17,60	0,09	0,02	0,37	0,04
		3	12,90	13,71	15,97	18,45	15,12					
		Média	12,13 b	12,96 b	16,03 a	16,06 a	14,23*					
PC	5,70	0	5,07	8,97	20,70	9,33	11,02	30,15	0,69	<0,01	0,52	0,02
		3	6,73	7,71	17,42	10,16	10,50					
		Média	5,90 b	8,34 b	19,06 a	9,74 b	10,76*					
MDA	0,71	0	0,62	0,58	1,09	0,82	0,78	18,22	0,27	<0,01	0,10	0,67
		3	0,58	0,72	0,82	0,74	0,72					
		Média	0,60 c	0,65 bc	0,96 a	0,78 b	0,75					
SOD	5,01	0	1,72 Ac	1,67 Ad	3,47 Aa	2,38 Ab	2,31	12,90	0,02	<0,01	<0,01	<0,01
		3	1,73 Ab	1,48 Ab	2,32 Ba	1,90 Aab	1,86					
		Média	1,72	1,57	2,89	2,14	2,02*					
CAT	357,13	0	201,20	119,80	205,40	163,40	172,45 A	24,57	0,03	0,22	0,31	<0,01
		3	150,00	133,59	124,02	118,53	131,53 B					
		Média	175,60	126,69	164,71	140,96	151,99*					
GST	5,51	0	4,85	8,56	11,66	11,53	9,15	14,37	0,30	<0,01	0,22	<0,01
		3	6,98	7,65	11,54	12,66	9,71					
		Média	5,91 c	8,10 b	11,60 a	12,09 a	9,43*					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p-valor > $\alpha = 0,05$), pelo teste de Duncan e pelo teste F, respectivamente. * Média do fatorial (imediatamente após o transporte) difere do valor antes do transporte, pelo teste F ao nível de 5% de significância.

Unidades de medidas: ON Óxido Nítrico ($\mu\text{mol L}^{-1}$); PC Proteínas Carboniladas (nmol mL^{-1}); MDA Malondialdeído ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína); SOD Superóxido Dismutase (U SOD mg^{-1} de proteína); CAT Catalase (U CAT mg^{-1} de proteína); GST Glutathiona S-transferase ($\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

3.2.4. Status redox no fígado logo após o transporte

Houve interação significativa entre OEC e o sal comum para ON, PC, MDA e SOD (Tabela 5). Na ausência de sal, o OEC causou diminuição do ON nas concentrações de 5, 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle. Na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC, a o teor de ON foi menor do que em 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 5). Na presença de sal, o OEC causou diminuição do ON na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC e aumento na concentração de 15 mg L⁻¹ de OEC em relação ao controle (Tabela 5). O sal causou redução do ON apenas na ausência de OEC (Tabela 5). Para a PC, na ausência de sal, não houve efeito do OEC enquanto que na presença de sal, houve redução no teor de PC nas concentrações de 5 e 15 mg L⁻¹ de OEC em relação ao controle e ao tratamento 10 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 5). O sal causou aumento no teor de PC apenas na ausência de OEC (Tabela 5). Para o MDA, na ausência de sal, o OEC causou diminuição no MDA apenas na concentração de 10 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 5). Na presença de sal, o OEC causou diminuição do MDA nas concentrações de 5, 10 e 15 mg L⁻¹, sendo os valores de MDA nos tratamentos 10 e 15 mg L⁻¹ menores do que o tratamento 5 mg L⁻¹ (Tabela 5). O sal causou aumento no MDA apenas na ausência de OEC (Tabela 5).

Para a atividade da SOD, tanto na ausência, como na presença de sal, o OEC causou aumento na atividade da SOD nas concentrações 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 5). O sal causou aumento na atividade da SOD nas concentrações 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 5). Não houve interação significativa entre OEC e o sal comum para a atividade da CAT e da GST (Tabela 5). Para a atividade da CAT, nenhum dos tratamentos com OEC diferiu significativamente do controle sem OEC, porém, o tratamento com 5 mg L⁻¹ resultou em menor atividade da enzima em relação aos tratamentos com 10 e 15 mg L⁻¹ (Tabela 5). O sal causou aumento na atividade da CAT independente das concentrações de OEC (Tabela 5). O OEC causou diminuição significativa na atividade da GST na concentração de 15 mg L⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios para as variáveis do status redox no fígado de *C. carpio* logo após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	Antes do transporte vs do transporte
ON	22,06	0	167,70 Aa	36,07 Ac	83,35 Ab	97,00 Ab	96,03	11,61	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		3	79,69 Bb	38,83 Ac	83,39 Ab	102,84 Aa	76,19					
		Média	123,69	37,45	83,37	99,92	86,11*					
PC	5,51	0	3,92 Ba	3,67 Aa	6,52 Aa	5,13 Aa	4,81	24,04	0,09	<0,01	0,02	0,76
		3	7,50 Aa	4,55 Ab	7,47 Aa	3,43 Ab	5,74					
		Média	5,71	4,11	6,99	4,28	5,27					
MDA	0,54	0	0,86 Ba	1,00 Aa	0,55 Ab	0,78 Aa	0,80	14,93	0,01	<0,01	0,01	<0,01
		3	1,32 Aa	1,05 Ab	0,72 Ac	0,67 Ac	0,94					
		Média	1,09	1,02	0,63	0,72	0,87*					
SOD	3,62	0	0,83 Ab	1,06 Ab	3,09 Ba	3,30 Ba	2,07	16,81	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		3	1,01 Ac	0,78 Ac	5,25 Aa	4,12 Ab	2,79					
		Média	0,92	0,92	4,17	3,71	2,43*					
CAT	574,62	0	568,18	341,88	468,07	611,36	497,37 B	17,52	0,01	0,02	0,07	0,70
		3	519,65	541,29	702,45	657,24	605,16 A					
		Média	543,91 ab	441,58 b	585,26 a	634,30 a	551,26					
GST	14,55	0	15,53	19,61	16,48	13,25	16,22	11,78	0,80	<0,01	0,15	0,15
		3	18,69	18,26	14,91	13,79	16,41					
		Média	17,11 ab	18,93 a	15,69 bc	13,52 c	16,31					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p-valor > $\alpha = 0,05$), pelo teste de Duncan e pelo teste F, respectivamente.

* Média do fatorial (imediatamente após o transporte) difere do valor antes do transporte, pelo teste F ao nível de 5% de significância.

Unidades de medidas: ON Óxido Nítrico ($\mu\text{mol L}^{-1}$); PC Proteínas Carboniladas (nmol mL^{-1}); MDA Malondialdeído ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína); SOD Superóxido Dismutase (U SOD mg^{-1} de proteína); CAT Catalase (U CAT mg^{-1} de proteína); GST Glutathiona S-transferase ($\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

251 **3.3. Efeitos do óleo de cravo e do sal comum sobre a recuperação de *C. carpio***
252 **submetidos ao transporte**

253

254 **3.3.1. Respostas de estresse 96 h após o transporte**

255 Não houve interação significativa entre OEC e o sal para glicose e lactato sanguíneos
256 96h após o transporte (Tabela 6). A inclusão de 5, 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC causou aumento no
257 teor de glicose sanguínea dos peixes após 96 h do transporte, independente da concentração de
258 sal (Tabela 6). Para o lactato sanguíneo não houve efeito significativo do OEC e do sal 96h
259 após o transporte (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios para glicose e lactato sanguíneo de *C. carpio* 96 horas após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			Antes do transporte vs 96h
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	
GLIC (mg dL ⁻¹)	45,83	0	57,25	73,00	84,25	70,25	71,31	13,01	0,32	0,01	0,15	<0,01
		3	65,67	75,92	73,92	84,92	75,10					
		Média	61,46 b	74,46 a	79,08 a	77,58 a	73,21*					
LACT (mg dL ⁻¹)	5,33	0	3,79	3,73	5,66	4,47	4,41	23,75	0,17	0,12	0,10	0,07
		3	2,67	4,66	3,63	4,34	3,83					
		Média	3,23	4,20	4,65	4,40	4,12					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (p -valor $> \alpha = 0,05$).

* Média do fatorial (96h após o transporte) difere do valor antes do transporte pelo teste F ao nível de 5% de significância.

270 3.3.2. Status redox nas brânquias 96 h após o transporte

271 Houve interação significativa entre o OEC e o sal para ON, PC e atividade da CAT
272 (Tabela 7). Na ausência de sal, o OEC causou aumento do ON nas concentrações de 5 e 15 mg
273 L⁻¹ de OEC, quando comparado as concentrações de 0 e 5 mg L⁻¹. Além disso o teor de ON no
274 tratamento 5 mg L⁻¹ foi maior que no 15 mg L⁻¹ (Tabela 7). Na presença de sal, o OEC causou
275 aumento do ON na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC e redução do ON nas concentrações de
276 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 7). O sal, na ausência de OEC causou aumento
277 no teor de ON, enquanto na concentração de 5 mg L⁻¹ reduziu o ON. Nas concentrações de 10
278 e 15 mg L⁻¹ de OEC o sal não apresentou efeito significativo para ON (Tabela 7).

279 Para PC, na ausência de sal, observamos o maior teor no tratamento com 5 mg L⁻¹ de
280 OEC em relação ao controle (Tabela 7). Os tratamentos com 10 e 15 mg L⁻¹ foram menores
281 que com 5 mg L⁻¹ (Tabela 7). Na presença de sal, o OEC causou diminuição das PC nas
282 concentrações de 5 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 7). Com relação ao efeito do
283 sal, na ausência de OEC houve aumento das PC, entretanto, na presença de OEC, em todas as
284 concentrações, o sal causou redução das PC (Tabela 7). Para o MDA não houve efeito
285 significativo do sal e do OEC (Tabela 7).

286 O OEC, independente da presença de sal, causou aumento significativo na atividade da
287 SOD na concentração de 10 mg L⁻¹ em relação as demais concentrações de OEC (Tabela 7). Na
288 ausência de sal, o OEC causou aumento na atividade da CAT nas concentrações de 10 e 15 mg
289 L⁻¹ em relação ao controle, porém, a atividade da CAT foi maior no tratamento 10 mg L⁻¹ do
290 que no 15 mg L⁻¹ (Tabela 7). Na presença de sal, o OEC causou aumento na atividade da CAT
291 nas concentrações de 5, 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC em relação ao controle, com maior valor na
292 concentração de 10 mg L⁻¹ (Tabela 7). Com relação ao efeito do sal, o mesmo causou aumento
293 na atividade da CAT na concentração de 5 mg L⁻¹ e redução na concentração de 15 mg L⁻¹ de

- 294 OEC (Tabela 7). Para a atividade da GST, não houve efeito significativo do sal e do cravo após
295 96h do transporte (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios para as variáveis do status redox nas brânquias de *C. carpio* 96 horas após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			Antes do transporte vs 96h
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	
ON	11,01	0	19,72 Bc	56,80 Aa	19,48 Ac	26,20 Ab	30,55	9,71	0,42	<0,01	<0,01	<0,01
		3	33,73 Ab	39,80 Ba	22,64 Ac	22,36 Ac	29,63					
		Média	26,72	48,30	21,06	24,28	30,09*					
PC	5,70	0	3,04 Bd	32,51 Aa	7,51 Ab	4,68 Ac	11,93	8,81	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		3	4,65 Aa	3,18 Bb	3,54 Bab	2,79 Bb	3,54					
		Média	3,84	17,84	5,52	3,73	7,73*					
MDA	0,71	0	0,77	0,81	0,68	0,72	0,74	15,99	0,81	0,28	0,79	0,58
		3	0,79	0,82	0,76	0,66	0,76					
		Média	0,78	0,81	0,72	0,69	0,75					
SOD	5,01	0	3,10	2,76	3,88	3,09	3,21	10,98	0,12	<0,01	0,09	<0,01
		3	2,92	3,01	3,74	2,21	2,97					
		Média	3,01 b	2,88 b	3,81 a	2,65 b	3,09*					
CAT	357,13	0	252,71 Ac	258,81 Bc	532,54 Aa	449,95 Ab	373,50	10,90	0,34	<0,01	<0,01	0,34
		3	256,12 Ac	384,50 Ab	560,83 Aa	359,28 Bb	390,17					
		Média	254,41	321,65	546,68	404,61	381,84					
GST	5,51	0	4,57	5,13	5,30	5,35	5,09	14,08	0,56	0,20	0,94	0,47
		3	4,76	5,01	5,68	5,61	5,26					
		Média	4,66	5,07	5,49	5,48	5,17					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p-valor > $\alpha = 0,05$), pelo teste de Duncan e pelo teste F, respectivamente.

* Média do fatorial (96h após o transporte) difere do valor antes do transporte, pelo teste F ao nível de 5% de significância.

Unidades de medidas: ON Óxido Nítrico ($\mu\text{mol L}^{-1}$); PC Proteínas Carboniladas (nmol mL^{-1}); MDA Malondialdeído ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína); SOD Superóxido Dismutase (U SOD mg^{-1} de proteína); CAT Catalase (U CAT mg^{-1} de proteína); GST Glutathiona S-transferase ($\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

3.3.3. Status redox no fígado 96 h após o transporte

Houve interação significativa entre o OEC e o sal apenas ON e atividade da GST (Tabela 8). Na ausência de sal, o OEC causou aumento do ON apenas na concentração de 15 mg L⁻¹, em relação ao controle, enquanto que na presença de sal, o OEC causou diminuição do ON na concentração de 5 mg L⁻¹ e aumento na de 15 mg L⁻¹ (Tabela 8). O sal causou redução do ON apenas na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 8). O OEC, independente da presença de sal, causou redução dos níveis de PC nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 8). O OEC causou aumento do MDA nas concentrações 5, 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC, sendo o teor de MDA maior nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao de 5 mg L⁻¹ (Tabela 8).

O OEC causou aumento na atividade da SOD na concentração de 5 mg L⁻¹ e diminuição na atividade da SOD nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 8). O OEC causou aumento na atividade da CAT nas concentrações de 5, 10 e 15 mg L⁻¹ de OEC (Tabela 8). Para a atividade da GST, na ausência de sal, o OEC causou diminuição na atividade nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹, com o tratamento 15 mg L⁻¹ apresentando menor atividade da GST do que no 10 mg L⁻¹ (Tabela 8). Na presença de sal, o OEC causou aumento na atividade da GST na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC e diminuição na atividade nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹ em relação ao controle (Tabela 8). O sal aumentou a atividade da GST nas concentrações de 0 e 5 mg L⁻¹ de OEC. (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios para as variáveis do status redox no fígado de *C. carpio* 96 horas após o transporte.

	Antes do transporte	Sal comum (g/L)	OEC (mg L ⁻¹)				Média	CV (%)	p-valor			Antes do transporte vs 96h
			0	5	10	15			Sal	OEC	Sal x OEC	
ON	22,06	0	47,15 Ab	44,59 Ab	45,43 Ab	58,64 Aa	48,95	10,66	0,03	<0,01	0,03	<0,01
		3	41,93 Ab	30,31 Bc	49,05 Aab	56,27 Aa	44,39					
		Média	44,54	37,45	47,24	57,45	46,67*					
PC	5,51	0	3,01	3,22	2,48	2,24	2,74	17,08	0,10	0,03	0,08	<0,01
		3	4,04	2,76	2,51	3,18	3,12					
		Média	3,52 a	2,99 ab	2,49 b	2,71 b	2,93*					
MDA	0,54	0	0,69	0,87	1,06	1,08	0,92	12,80	0,12	<0,01	0,86	<0,01
		3	0,80	0,93	1,08	1,21	1,00					
		Média	0,74 c	0,90 b	1,07 a	1,14 a	0,96*					
SOD	3,62	0	2,58	3,26	2,18	2,14	2,54	10,35	0,89	<0,01	0,45	<0,01
		3	2,68	3,49	1,90	2,15	2,56					
		Média	2,63 b	3,37 a	2,04 c	2,14 c	2,55*					
CAT	574,62	0	365,40	406,85	469,35	412,93	413,63	9,99	0,91	0,02	0,20	<0,01
		3	357,89	449,42	410,45	444,63	415,59					
		Média	361,64 b	428,13 a	439,90 a	428,78 a	414,61*					
GST	14,55	0	20,61 Ba	21,69 Ba	14,19 Ab	10,95 Ac	16,86	8,98	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		3	25,02 Ab	27,98 Aa	12,62 Ac	11,62 Ac	19,31					
		Média	22,82	24,84	13,41	11,29	18,09*					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (p-valor > $\alpha = 0,05$), pelo teste de Duncan e pelo teste F, respectivamente.

* Média do fatorial (96h após o transporte) difere do valor antes do transporte, pelo teste F ao nível de 5% de significância.

Unidades de medidas: ON Óxido Nítrico ($\mu\text{mol L}^{-1}$); PC Proteínas Carboniladas (nmol mL^{-1}); MDA Malondialdeído ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína); SOD Superóxido Dismutase (U SOD mg^{-1} de proteína); CAT Catalase (U CAT mg^{-1} de proteína); GST Glutathiona S-transferase ($\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

374 4. Discussão

375 O transporte de *C. carpio* causou alterações na qualidade da água típicas do transporte
376 de longa duração, como redução do pH e aumento da amônia não ionizada (ABREU et al.,
377 2008; BHUIYAN et al., 2022; HOSEINI et al., 2022; PARODI et al., 2014; PRAMOD et al.,
378 2010; SAMPAIO & FREIRE, 2016). O transporte também causou estresse oxidativo nos
379 peixes, caracterizado pelo aumento no teor de espécies reativas (ON), danos em proteínas (PC)
380 e redução da proteção contra danos oxidativos pela diminuição na atividade das enzimas SOD
381 e CAT nas brânquias. Quadro semelhante tem sido observado na maioria das espécies de peixes
382 submetidas ao transporte (ARIOTTI et al., 2021; AZAMBUJA et al., 2011; BARBAS et al.,
383 2017; DU et al., 2016). No fígado, o transporte causou aumento de espécies reativas (ON),
384 peroxidação de lipídios (MDA) e redução da proteção contra danos oxidativos (redução na
385 atividade da enzima SOD), o que indica maior atividade mitocondrial nos hepatócitos, pois esta
386 é a principal causa da geração de espécies reativas e danos oxidativos (NOORI, 2012;
387 PISOSCHI & POP, 2015). Após o transporte, a redução do lactato sanguíneo não era esperada,
388 mas deve estar relacionada com o alto teor de oxigênio nas embalagens, que proporcionou
389 condições para manutenção do metabolismo aeróbico. Para glicose sanguínea, apesar de não
390 termos observado efeito significativo do transporte, houve tendência de aumento. Assim, a
391 redução do lactato e a glicose inalterada no sangue dificulta a caracterização de respostas de
392 estresse, comumente observadas em peixes submetidos ao transporte (BERKA, 1986;
393 VANDERZWALMEN et al., 2019).

394 Após 96h do transporte, os peixes não conseguiram recuperar do estresse oxidativo
395 causado nas brânquias, uma vez que o teor de espécies reativas (ON) e os danos em proteínas
396 (PC) permaneceram altos e a proteção contra danos oxidativos continuou comprometida pela
397 diminuição da atividade da enzima SOD. No fígado, 96h após o transporte, apesar da redução
398 no teor de proteínas carboniladas e aumento na atividade da enzima GST, o status redox

399 continuou predominantemente caracterizado pelos danos oxidativos, quando comparado com
400 os peixes antes do transporte, uma vez que os teores de ON e MDA permaneceram altos e a
401 atividade das enzimas SOD e CAT foi menor. O lactato sanguíneo retornou aos valores basais
402 após 96h do transporte, o que corrobora com a hipótese do alto teor de oxigênio como causa da
403 redução observada nos peixes logo após o transporte (VIRANI & REES, 2000). Entretanto, o
404 tempo de 96 h não foi suficiente para a recuperação do estresse, pois a glicemia foi maior do
405 que antes do transporte.

406 Um sedativo para ser considerado eficaz no transporte de peixes deve promover rápida
407 redução do metabolismo (INOUE, SANTOS NETO & MORAES, 2003), diminuição das
408 respostas de estresse (HOSEINI, 2011), bem como manutenção do status redox (GRESSLER
409 et al., 2014) e da qualidade da água (HARMON, 2009). Para ser considerado seguro, não deve
410 causar danos aos peixes e ao meio ambiente. Apesar da vasta literatura mostrando a eficácia do
411 óleo de cravo como sedativo durante o transporte de várias espécies de peixes (JAVAHERY,
412 NEKOUBIN & MORADLU, 2012), no presente estudo, o mesmo não influenciou as respostas
413 de estresse (lactato e glicose sanguíneos) imediatamente após o transporte e provavelmente não
414 reduziu o metabolismo, uma vez que houve maior excreção de amônia nas concentrações de 10
415 e 15 mg L⁻¹, o que sugere maior catabolismo de proteínas e mobilização de aminoácidos para
416 gliconeogênese (RANDALL & TSUI, 2002). Apesar do OEC ser utilizado como redutor das
417 respostas de estresse durante o transporte de peixes, em algumas espécies o mesmo pode causar
418 elevação do cortisol e da glicose sanguíneos logo após sua administração (CHO & HEATH,
419 2000; MARICCHIOLO & GENOVESE, 2011; WEBER et al., 2011). Durante a recuperação
420 dos peixes da anestesia/sedação ocorre aumento da frequência de ventilação branquial, o que
421 aumenta a velocidade de eliminação de anestésicos do sangue dos peixes (KIESSLING et al.,
422 2009). Entretanto, o aumento na ventilação também causa distúrbios osmóticos em peixes
423 anestesiados com óleo de cravo e consequente elevação prolongada do cortisol plasmático

424 (SINK & NEAL, 2009), o que pode explicar o aumento na glicemia de *C. carpio* após 96 h do
425 transporte em todas concentrações de OEC avaliadas.

426 Nas brânquias, logo após o transporte, o OEC apesar de ter proporcionado maior
427 atividade de algumas enzimas antioxidantes, também causou aumento de espécies reativas
428 (ON), de danos oxidativos em lipídios (MDA) e em proteínas (PC) nas concentrações de 10 e
429 15 mg L⁻¹ de OEC, o que aumenta as evidências de que o óleo de cravo não foi seguro como
430 sedativo durante o transporte de carpas nestas concentrações. Tais resultados não eram
431 esperados, pois o cravo é um potente antioxidante (GÜLÇIN, ELMASTAŞ & ABOUL-ENEIN
432 2012), com amplas evidências na literatura de seu efeito protetor contra danos oxidativos em
433 diferentes espécies de peixes (ABDELKHALEK et al., 2020; GÜLÇIN et al., 2004). Portanto,
434 tais efeitos devem estar relacionados com a ação irritante do OEC. Apesar de WONG et al.
435 (2014) terem observado que o óleo de cravo é um dos anestésicos que causam menor aversão
436 ao *Danio rerio*, outros autores relatam agitação e natação de escape em peixes submetidos a
437 anestesia com óleo de cravo (MCCORD et al., 2020; SINK, STRANGE & SAWYERS, 2007).
438 Como os peixes reagem a substâncias irritantes na água aumentando a produção de muco nas
439 brânquias (MALLATT, 1985), tal fato pode resultar em redução na oxigenação do sangue
440 devido à maior distância para difusão do oxigênio. A utilização de sal comum tanto
441 isoladamente como na presença de OEC praticamente não causou efeitos no status redox nas
442 brânquias logo após ao transporte. Entretanto, no fígado, o sal utilizado isoladamente, apesar
443 de ter reduzido ON, causou estresse oxidativo (aumento em PC e MDA). Neste órgão, o OEC,
444 quando utilizado isoladamente, apresentou proteção parcial contra o estresse oxidativo, porém,
445 este foi consideravelmente maior na presença de sal comum com redução de PC e MDA e
446 aumento na atividade da enzima SOD. Assim, tanto o OEC influenciou os efeitos do sal comum
447 sobre o status redox, como o sal influenciou os efeitos do OEC no fígado. O OEC parece exercer

448 efeito protetor contra os danos oxidativos causados pelo sal comum no fígado, bem como o sal
449 aumenta os efeitos protetores do OEC contra o estresse oxidativo.

450 Após o tempo de 96 h para avaliar os efeitos dos aditivos na recuperação dos peixes, o
451 OEC, em quase todas as concentrações, causou aumento de ON e PC nas brânquias. O sal,
452 quando utilizado isoladamente, causou efeito semelhante. Entretanto, o sal na presença de OEC
453 causou redução nos danos oxidativos (redução de ON e PC e aumento da atividade da CAT), o
454 que indica que estes aditivos podem mitigar danos oxidativos, quando usados simultaneamente,
455 particularmente na concentração de 5 mg L⁻¹ de OEC.

456 A avaliação da recuperação do status redox no fígado após 96 h mostrou que este tempo
457 foi suficiente para neutralizar os efeitos negativos do sal comum. Com relação aos efeitos do
458 OEC, apesar de ter ocorrido redução dos danos em proteínas nas concentrações de 10 e 15 mg
459 L⁻¹, e aumento na atividade da CAT em todas as concentrações, o aumento do MDA, em todas as
460 concentrações, e a redução na atividade da SOD e GST nas concentrações de 10 e 15 mg L⁻¹
461 mostram que nenhum dos aditivos usados isoladamente foi eficaz. Quando utilizado em
462 associação com o sal, o OEC apenas na concentração de 5 mg L⁻¹ proporcionou efeito positivo
463 na recuperação do status redox (redução de ON aumento na atividade da GST). Deste modo, o
464 OEC pode ser considerado seguro apenas na dose de 5 mg L⁻¹, em associação com 3 g L⁻¹ de
465 sal comum durante o transporte de *C. carpio*, pois nas maiores concentrações houve danos
466 oxidativos nas brânquias e no fígado.

467 A utilização de 3 g/L de sal comum na água causou redução na excreção de amônia,
468 provavelmente pela redução na demanda por energia devido a diminuição do gradiente
469 osmótico e iônico entre o meio interno e externo (água doce), o que reduz a movimentação de
470 íons contra o gradiente de concentração através das células ricas em mitocôndrias nas brânquias
471 (CROSBY et al., 2006; MCDONALD & MILLIGAN et al., 1997). Desse modo, os peixes
472 apresentaram menor demanda por energia e menores distúrbios na homeostase glicêmica, e

473 assim, mobilizaram menor quantidade de aminoácidos para gliconeogênese (POLAKOF et al.,
474 2012), o que resulta em menor desaminação de aminoácidos e menor excreção de amônia
475 (RANDALL & TSUI, 2002). A redução da glicemia causada pelo sal corrobora a hipótese de
476 menor necessidade energética pelos peixes quando mantidos em um ambiente com menor
477 gradiente osmótico em relação ao meio interno. Além disso, o sal mitigou o efeito negativo do
478 OEC (10 e 15 mg L⁻¹) na excreção de amônia.

479 Os resultados observados permitem concluir que OEC isoladamente, nas concentrações
480 avaliadas, não é indicado para o transporte de carpas, principalmente por causar aumento na
481 amônia não ionizada na água, considerado o principal fator limitante do transporte de longa
482 duração (SAMPAIO & FREIRE, 2016), bem como desencadear estresse oxidativo nas
483 brânquias e fígado. Apesar da utilização do sal comum ter proporcionado redução no teor de
484 amônia na água, sua utilização isolada também não é recomendada, uma vez que este causou
485 danos oxidativos no fígado e nas brânquias, efeitos ainda não relatados na literatura. Entretanto,
486 a utilização do sal em associação com 5 mg L⁻¹ OEC proporcionou os melhores resultados tanto
487 logo após, como 96 h após o transporte. Nas brânquias, após 96 h, o sal reduziu ON na presença
488 de 5 mg L⁻¹ de OEC e o OEC, na presença de sal, reduziu PC e aumentou a atividade da CAT.
489 No fígado, logo após o transporte, houve redução de ON e dos danos oxidativos (PC e MDA),
490 ao passo que 96 h após o transporte, houve redução de ON e aumento na atividade da GST.
491 Deste modo, a utilização destes aditivos em associação (5 mg L⁻¹ de OEC + 3 g L⁻¹ de sal
492 comum) proporcionou melhor manutenção da qualidade da água (menor teor de amônia) e do
493 status redox nas brânquias e no fígado de *C. carpio* submetidos ao transporte de longa duração.

5. Referências bibliográficas

- ABDELKHALEK, N. K., RISHA, E., MOHAMED, A., SALAMA, M. F., & DAWOOD, M. A. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of clove oil against *Streptococcus iniae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effect on hepatic hepcidin expression. **Fish Shellfish Immunol**, 104, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.064>
- ABREU, J. S., SANABRIA-OCHOA, A. I., GONÇALVES, F. D. & URBINATI, E. C. (2008). Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. **Ciênc Rural**, 38(5), 1413-1417. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500034>
- AFIFI, S. H., AL-THOBAITI, S. & RASEM, B. M. (2000). Multiple exposure of Asian sea bass, (*Lates calcarifer*, Centropomidae) to clove oil: a histopathological study. **Assiut Vet Med J**, 42(84), 166-174. Doi: 10.21608/AVMJ.2000.180482
- ARIEL, E. (2005). Ornamental fish as trans-boundary vectors of viral diseases. **Diseases in Asian Aquaculture V**, 103-112.
- ARIOTTI, K., MARCON, J. L., FINAMOR, I. A., BRESSAN, C. A., DE LIMA, C. L., SOUZA, C. D., CARON, B. O., HEIZMANN, B. M., BALDISSEROTTO B. & PAVANATO, M. A. (2021). *Lippia alba* essential oil improves water quality during transport and accelerates the recovery of *Potamotrygon wallacei* from the transport-induced stress. **Aquaculture**, 545, 737176. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737176>
- AZAMBUJA, C. R., MATTIAZZI, J., RIFFEL, A. P., FINAMOR, I. A., DE OLIVEIRA GARCIA, L., HELDWEIN, C. G., BALDISSEROTTO, 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(1-2), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>
- BARBAS, L. A. L., MALTEZ, L. C., STRINGHETTA, G. R., DE OLIVEIRA GARCIA, L., MONSERRAT, J. M., DA SILVA, D. T., HEINZMANN, B. M. & SAMPAIO, L. A. (2017). Properties of two plant extractives as anaesthetics and antioxidants for juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, 469, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.012>
- BERKA, R. (1986). The transport of live fish: a review. **Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations**. (Vol. 48. Pp. 1-52).
- BHUIYAN, A. R., HOSSAIN, M. M., UDDIN, M. N., HOSSAIN, M. A., HOSSAIN, M. I. & HAIDER, M. N. (2022). Changes in viable bacterial counts and physicochemical parameters of water used during live transportation of Pangasius catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Bangladesh. **J Adv Vet Anim Res**, 9(1), 67-78. Doi: 10.5455/javar.2022.i570
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- BUEGE, J. A., & AUST, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol** (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- CARNEIRO, P. C. F. & URBINATI, E. C. (2002). Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquac Int**, 10(3), 221-229. <https://doi.org/10.1023/A:1022166411089>
- CHO, G. K. & HEATH, D. D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquac**, 31(6), 537-546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00478.x>
- COSTA, S. M., LEMOS, T. L., PESSOA, O. D., ASSUNÇÃO, J. C. & BRAZ-FILHO, R. (2002). Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Rev Bras Farmacogn**, 12, 66-67. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300032>
- CROSBY, T. C., HILL, J. E., WATSON, C. A., YANONG, R. P. & STRANGE, R. (2006). Effects of tricaine methanesulfonate, hypno, metomidate, quinaldine, and salt on plasma cortisol levels following acute stress in threespot gourami *Trichogaster trichopterus*. **J Aquat Anim Health**, 18(1), 58-63. <https://doi.org/10.1577/H05-026.1>
- DA CUNHA, M. A., DE BARROS, F. M., DE OLIVEIRA GARCIA, L., DE LIMA VEECK, A. P., HEINZMANN, B. M., LORO, V. L., EMANUELLI, T. & BALDISSEROTTO, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 306(1-4), 403-406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>
- DIETERICH, S., BIELIGK, U., BEULICH, K., HASENFUSS, G., & PRESTLE, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, 101(1), 33-39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>
- 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(11), 3599-3607. <https://doi.org/10.1111/are.12812>
- DUAN, R., ZHANG, J., DU, X., YAO, X. & KONNO, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food chemistry**, 112(3), 702-706.
- EMERSON, K., RUSSO, R. C., LUND, R. E. & THURSTON, R. V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **J. Fish. Res. Board Can.**, 32(12), 2379-2383.
- FAVERO, G. C., E SILVA, W. D., BOAVENTURA, T. P., LEME, F. D. & LUZ, R. K. (2019). Eugenol or salt to mitigate stress during the transport of juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a Neotropical carnivorous freshwater catfish. **Aquaculture**, 512, 734321. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734321>
- FERREIRA, E.B., CAVALCANTI, P.P., NOGUEIRA, D.A. (2021). ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues). R package version 1.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>

- FERREIRA, P.D., ROCHA, J.S., GOMES, J.R., CALDAS, D.W., MARTINS, M.T., DE OLIVEIRA, J.M., SALARO, A. L. & ZUANON, J. A. (2017). Curcuma longa supplementation in the diet of *Astyanax aff. bimaculatus* in preparation for transport. **Aquac Res**, 48(8), 4524-4532. <https://doi.org/10.1111/are.13277>
- FUJIMOTO, R. Y., PEREIRA, D. M., SILVA, J. C., DE OLIVEIRA, L. C., INOUE, L. A., HAMOY, M., DE MELLO, V. J., TORRES, M. F. & BARBAS, L. A. (2018). Clove oil induces anaesthesia and blunts muscle contraction power in three Amazon fish species. **Fish Physiol Biochem**, 44(1), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0430-8>
- GOMES, L. D., ARAUJO-LIMA, C. A., ROUBACH, R. & URBINATI, E. C. (2003). Assessment on the effect of salt and density on tambaqui fish transportation. **Pesqui Agropecu Bras**, 38(2), 283-290. Doi: 10.1590/S0100-204X2003000200016
- GOMES, L. D. (2003a). Protocolo para o transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*) vivo. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, Documentos; 27 (INFOTECA-E).
- GRIESS, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt ueber einege Azoverbindungen. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, 12, 426-428. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>
- GRUSH, J., NOAKES, D. L., & MOCCIA, R. D. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, 1(1), 46-53. <https://doi.org/10.1089/154585404774101671>
- GÜLÇİN İ., GÜNGÖR SAT I., BEYDEMİR S., ELNASTAŞ M., KÜFRE VİOĞLU Ö.İ. (2004) Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.), **Food Chem**, 87, 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.008>
- GÜLÇİN, İ., ELMASTAŞ, M., & ABOUL-ENEIN, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arab J Chem**, 5(4), 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.016>
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.**, 249, 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- HADWAN, M. H. & ABED, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. **Data Brief**, 6, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
- HAJEK, G. J., KLYSZEJKO, B. & DZIAMAN, R. (2006). The anaesthetic effects of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyol Piscat**, 2(36), 93-97. Doi: 10.3750/AIP2006.36.2.01.
- HARMON, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. **Rev Aquac**, 1(1), 58-66. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x>

- HOSEINI, S. M. (2011). Efficacy of clove powder solution on stress mitigation in juvenile common carps, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Comp Clin Path**, 20(4), 359-362. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1002-9>
- HOSEINI, S. M., GUPTA, S. K., YOUSEFI, M., KULIKOV, E. V., DRUKOVSKY, S. G., PETROV, A. K., MIRGHAED A. T., HOSEINIFAR, S. H. & VAN DOAN, H. (2022). Mitigation of transportation stress in common carp, *Cyprinus carpio*, by dietary administration of turmeric. **Aquaculture**, 546, 737380. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737380>
- HOSEINI, S. M., TAHERI MIRGHAED, A. & YOUSEFI, M. (2018). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. **Rev Aquac**, 11, 550–564. <https://doi.org/10.1111/raq.12245>
- INOUE, L. A., AFONSO, L. O., IWAMA, G. K., & MORAES, G. (2005). Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazon**, 35(2), 289-295. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672005000200018>
- INOUE, L. A., SANTOS NETO, C. D. & MORAES, G. (2003). Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Cienc Rural**, 33(5), 943-947. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500023>
- IVERSEN, M., FINSTAD, B., MCKINLEY, R. S. & ELIASSEN, R. A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, 221(1-4), 549-566. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00111-X)
- JAVAHERY, S., NEKOUBIN, H. & MORADLU, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish. **Fish Physiol Biochem**, 38(6), 1545-1552. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>
- KIESSLING, A., JOHANSSON, D., ZAHL, I. H. & SAMUELSEN, O. B. (2009). Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, 286(3-4), 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.037>
- KING, W., HOOPER, B., HILLSGROVE, S., BENTON, C. & BERLINSKY, D. L. (2005). The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquac Res**, 36(14), 1442-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x>
- LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. P. & SHACTER, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 233, 346-357. Doi: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9
- MALLATT, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can J Fish Aquat Sci**, 42(4), 630-648. <https://doi.org/10.1139/f85-083>
- MARICCHIOLO, G., & GENOVESE, L. (2011). Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. **Open Mar Biol J**, 5(1). Doi: 10.2174/1874450801105010024

- MAZIK, P. M., SIMCO, B. A. & PARKER, N. C. (1991). Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. **Trans Am Fish Soc**, 120(1), 121-126. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1991\)120<0121:IOWHAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1991)120<0121:IOWHAS>2.3.CO;2)
- MCCORD, C. L., WHITELEY, E., LIANG, J., TREJO, C., CAPUTO, R., ITEHUA, E., HASAN, H., HERNANDEZ, S., JAGNANDAN, K. & FUDGE, D. (2020). Concentration effects of three common fish anesthetics on Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). **Fish Physiol Biochem**, 46(3), 931-943. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00761-4>
- MCDONALD, G. & MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K. et al. (org) **Fish stress and health in aquaculture**, Cambridge, Reino Unido. Cambridge University Press 62, 119-145, 290p.
- MEINELT, T., SCHRECKENBACH, K., PIETROCK, M., HEIDRICH, S. & STEINBERG, C. E. (2008). Humic substances. Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. **Environ Sci Pollut Res Int**, 15(1), 17. Doi: 10.1065/espr2007.08.448
- MIFSUD, C. & ROWLAND, S. J. (2008). Use of salt to control ichthyophthiriosis and prevent saprolegniosis in silver perch, *Bidyanus bidyanus*. **Aquac Res**, 39(11), 1175-1180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01981.x>
- MIRGHAED, A. T. & GHELICHPOUR, M. (2019). Effects of anesthesia and salt treatment on stress responses, and immunological and hydromineral characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) subjected to transportation. **Aquaculture**, 501, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.008>
- MITJANA, O., BONASTRE, C., INSUA, D., FALCETO, M. V., ESTEBAN, J., JOSA, A. & ESPINOSA, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, 433, 491-495. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.013>
- NOORI, S. (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. **Open access sci rep**, 1(8), 1-9. <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.413>
- OBA, E. T., MARIANO, W. D. & SANTOS, L. D. (2009). Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **Macapá: Embrapa Amapá**, 226-247.
- PAN, C. H., CHIEN, Y. H. & WANG, Y. J. (2010). The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. **Aquac Res**, 41(7), 973-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02380.x>
- PARK, M. O., HUR, W. J., IM, S. Y., SEOL, D. W., LEE, J. & PARK, I. S. (2008). Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquac Res**, 39(8), 877-884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01941.x>

- PARK, M. O., IM, S. Y., SEOL, D. W. & PARK, I. S. (2009). Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. **Aquaculture**, 287(3-4), 427-430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.049>
- PARODI, T. V., CUNHA, M. A., BECKER, A. G., ZEPPENFELD, C. C., MARTINS, D. I., KOAKOSKI, G., BARCELLOS, L. G., HEINZMANN, B. M. & BALDISSEROTTO, B. (2014). Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol Biochem**, 40(2), 323-334. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9845-z>
- PERDIKARIS, C., NATHANAILIDES, C., GOUVA, E., GABRIEL, U. U., BITCHAVA, K., ATHANASOPOULOU, F., PASCHOU, A. & PASCHOS, I. (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). **Acta Vet Brno**, 79(3), 481-490. <https://doi.org/10.2754/avb201079030481>
- PISOSCHI, A. M. & POP, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- POLAKOF, S., PANSERAT, S., SOENGAS, J. L., & MOON, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. **J Comp Physiol**, 182(8), 1015-1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>
- PORTZ, D. E., WOODLEY, C. M. & CECH, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. **Rev Fish Biol Fish**, 16(2), 125-170. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-9012-z>
- PRAMOD, P. K., SAJEEVAN, T. P., RAMACHANDRAN, A., THAMPY, S. & PAI, S. S. (2010). Effects of two anesthetics on water quality during simulated transport of a tropical ornamental fish, the Indian tiger barb *Puntius filamentosus*. **N Am J Aquac**, 72(4), 290-297. <https://doi.org/10.1577/A09-063.1>
- R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RANDALL, D. J., & TSUI, T. K. (2002). Ammonia toxicity in fish. **Mar Pollut Bull**, 45(1-12), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- RANDALL, D. J., & WRIGHT, P. A. (1989). The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. **Can J Zool**, 67(12), 2936-2942. <https://doi.org/10.1139/z89-416>
- SACCOL, E. M., TONI, C., PÊS, T. S., OURIQUE, G. M., GRESSLER, L. T., SILVA, L. V., MOURÃO, R. H., OLIVEIRA, R. B., BALDISSEROTTO, B. & PAVANATO, M. A. (2017). Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquac res**, 48(5), 2012-2031. <https://doi.org/10.1111/are.13034>
- SALARO, A. L., CAMPELO, D. A., TAVARES, M. M., BRAGA, L. G., PONTES, M. D. & ZUANON, J. A. (2015). Transport of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 in saline water. **Acta Sci Biol Sci**, 37(2), 137-142. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i2.26884>

- SAMPAIO, F. D. & FREIRE, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish Fish (Oxf)**, 17(4), 1055-1072. <https://doi.org/10.1111/faf.12158>
- SELOSSE, P. M. & ROWLAND, S. J. (1990). Use of common salt to treat ichthyophthiriasis in Australian warmwater fishes. **Progress Fish Cult**, 52(2), 124-127. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1990\)052<0124:UOCSTT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1990)052<0124:UOCSTT>2.3.CO;2)
- SINK, T. D. & NEAL, J. W. (2009). Stress response and posttransport survival of hybrid striped bass transported with or without clove oil. **N Am J Aquac**, 71(3), 267-275. <https://doi.org/10.1577/A08-040.1>
- SINK, T. D., STRANGE, R. J. & SAWYERS, R. E. (2007). Clove oil used at lower concentrations is less effective than MS-222 at reducing cortisol stress responses in anesthetized rainbow trout. **N Am J Fish Manag**, 27(1), 156-161. <https://doi.org/10.1577/M05-103.1>
- SINGH, A. K. & LAKRA, W. S. (2011). Risk and benefit assessment of alien fish species of the aquaculture and aquarium trade into India. **Rev Aquac**, 3(1), 3-18.
- SLOMAN, K. A., MOTHERWELL, G., O'CONNOR, K. & TAYLOR, A. C. (2000). The effect of social stress on the standard metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. **Fish Physiol Biochem**, 23(1), 49-53. <https://doi.org/10.1023/A:1007855100185>
- VANDERZWALMEN, M., EATON, L., MULLEN, C., HENRIQUEZ, F., CAREY, P., SNELLGROVE, D., & SLOMAN, K. A. (2019). The use of feed and water additives for live fish transport. **Rev Aquac**, 11(1), 263-278. <https://doi.org/10.1111/raq.12239>
- VELISEK, J., STARA, A., LI, Z. H., SILOVSKA, S., & TUREK, J. (2011). Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, 310(3-4), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>
- VELISEK, J., SVOBODOVA, Z., PIACKOVA, V., GROCH, L. & NEPEJCHALOVA, L. (2005). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Vet Med – Czech**, 50(6), 269-275. Doi:10.17221/5623-VETMED
- VIRANI, N. A., & REES, B. B. (2000). Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 126(3), 397-405. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00219-1)
- WAGNER, G. N., SINGER, T. D. & SCOTT MCKINLEY, R. (2003). The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquac res**, 34(13), 1139-1146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00916.x>
- WEBER, R. A., PÉREZ-MACEIRA, J. J., PELETEIRO, J. B., GARCÍA-MARTÍN, L., & ALDEGUNDE, M. (2011). Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, 321(1-2), 108-112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.029>

WEDEMEYER, G. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. **Springer Science & Business Media**.

WONG, D., VON KEYSERLINGK, M. A., RICHARDS, J. G., & WEARY, D. M. (2014). Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. **PLoS One**, 9(2), e88030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088030>

WOOD, C. M. (2001). Toxic responses of the gill. In: **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**, 1, 1-89.

YARAHMADI, P., MIANDARE, H. K., FAYAZ, S. & CAIPANG, C. M. (2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunol**, 48, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007>

ANEXOS

ANEXO I: Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção (CEUAP).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone:(31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 20 de janeiro de 2020

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Eficácia e segurança do óleo de cravo-da-índia e do sal comum em *Cyprinus carpio* submetidos ao transporte**", protocolo nº **0136/2019**, sob a responsabilidade de **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi apreciado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **09 de dezembro de 2019**.

Finalidade: **Pesquisa** **Ensino**

Vigência do Projeto: de **02 de fevereiro de 2020** a **26 de fevereiro de 2021**

Espécie/linhagem: **Carpa (*Cyprinus carpio*)** Nº de animais: **600**

Peso: **5,0g** Idade: **03 meses** Sexo: **Macho/Fêmea** Origem: **Piscicultura AQUACEL PEIXES ORNAMENTAIS Cnpj: 22.677.916/0001-13 / Endereço: Sítio Barrinha, Zona Rural, s/n, Patrocínio do Muriaé, MG, CEP 36860-000. Responsável :Gabriel Miranda Batista**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Efficacy and safety of clove oil and common salt in *Cyprinus carpio* transported**", protocol nº **0136/2019**, under the responsibility of **Jener Alexandre Sampaio Zuanon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Dec, 09th, 2019**.

Finality: **Research** **Education**

Duration of the Project: from **Feb. 02th, 2020** to **Feb, 26th, 2021**.

Species / strain: **Common carp (*Cyprinus carpio*)** Nº of animals: **600**

Weight: **5,0g** Age: **03 months** Sex: **Male/Female** Source: **Piscicultura AQUACEL PEIXES ORNAMENTAIS Cnpj: 22.677.916/0001-13 / Endereço: Sítio Barrinha, Zona Rural, s/n, Patrocínio do Muriaé, MG, CEP 36860-000. Responsável :Gabriel Miranda Batista**

Luciana Navajas Rennó

Luciana Navajas Rennó

Coordenadora da CEUAP/UFV

**ANEXO II: Níveis de garantia da ração TEC Peixe 45 fornecidos pela fabricante Soma
Nutrição Animal.**

NÍVEIS DE GARANTIA	
Umidade (Máx.)	130,00 g/kg
Proteína bruta (Mín.)	450,00g/kg
Extrato etéreo (Mín.)	100,00g/kg
Fibra bruta (Máx.)	40,00g/kg
Matéria mineral (Máx.)	150,00g/kg
Cálcio (Mín.)	12,00g/kg
Cálcio (Máx.)	35,00g/kg
Fósforo (Mín.)	10,00g/kg
Mananoligossacarídeos (Mín.)	230,00mg/kg
Metionina (Mín.)	9.000,00mg/kg
Lisina (Mín.)	19,00g/kg
Vitamina C (Mín.)	1.000,00mg/kg