

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Bruna Tomazetti Michelotti

**CITRAL COMO ADITIVO NA RAÇÃO PARA PEIXES MARINHOS
COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES: ENZIMAS
DIGESTIVAS E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E METABÓLICOS**

Santa Maria, RS

2020

Bruna Tomazetti Michelotti

**CITRAL COMO ADITIVO NA RAÇÃO PARA PEIXES MARINHOS COM
DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES: ENZIMAS DIGESTIVAS E
PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E METABÓLICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição de Monogástricos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius R. Cerqueira

Santa Maria, RS

2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Michelotti, Bruna Tomazetti
CITRAL COMO ADITIVO NA RAÇÃO PARA PEIXES MARINHOS COM
DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES: ENZIMAS DIGESTIVAS E
PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E METABÓLICOS / Bruna Tomazetti
Michelotti.- 2020.
94 p.; 30 cm

Orientador: Bernardo Baldisserotto
Coorientador: Vinícius Ronzani Cerqueira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2020

1. piscicultura marinha 2. citral 3. hábito alimentar
4. parâmetros zootécnicos I. Baldisserotto, Bernardo II.
Cerqueira, Vinícius Ronzani III. Título.

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

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

Bruna Tomazetti Michelotti

CITRAL COMO ADITIVO NA RAÇÃO PARA DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES DE PEIXES MARINHOS: ENZIMAS DIGESTIVAS E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E METABÓLICOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição de Monogástricos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Zootecnia**.

Aprovada em 30 de março de 2020.



Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto
(Presidente/orientador)

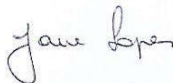


Prof. Dr. Luciano Garcia (parecer) (FURG)

Prof. Dr. Marcelo Borges Tesser (parecer) (FURG)



Profª. Dra. Ana Lúcia Salaro (parecer) (UFV)



Profª. Dra. Jane Mello Lopes (parecer) (UFMA)
Santa Maria, RS

2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e família pelo apoio oferecido e por terem construído condições para que essa formação fosse possível. Ao meu irmão por ser meu parceiro de vida e estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador que foi professor, psicólogo, orientador e teve muita paciência durante essa caminhada que por horas parecia-me impossível de ser completada. Obrigada professor Bernardo o senhor foi excepcional!

A todos os animais que participaram do processo, afinal eles são o grande motivo pelo qual optei por essa profissão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao universo que apesar de todos os contras sempre conspirou a meu favor.

As instituições Universidade Federal de Santa Maria e Universidade Federal de Santa Catarina por me fornecerem todas as ferramentas necessárias para que pudesse completar mais essa etapa acadêmica e de crescimento pessoal.

Aos órgãos financiadores CNPQ e CAPES pelas bolsas de estudos durante meu mestrado e doutorado, respectivamente.

Ao meu coorientador Vinicius Ronzani Cerqueira que me cedeu o laboratório para que fossem possíveis as experimentações animais.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Piscicultura Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina que me ajudaram durante os três experimentos relatados durante a tese. Mas, principalmente, ao Caio Magnotti que foi amigo, parceiro e muito importante nas fases difíceis e cansativas das experimentações. Foi meu apoio e a voz que pedia calma quando não a tinha.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade Federal de Santa Maria. Em especial a minha grande parceira Natacha Cossetin Mori, a qual certamente foi uma das pessoas mais importantes durante todo o processo e trabalhos, sempre disposta a ajudar e sem medo algum do trabalho pesado. Tu és uma pessoa admirável.

A minha amiga Ana Carolina Klinger que foi fundamental para a conclusão desse curso, foi meu apoio, uma boa conversa e um abraço apertado, assim como aquela que falou o que eu precisava escutar, por mais duro que fosse. Parte dessa conquista é tua.

Aos amigos Aline Kronbauer, Tiéli Minussi, Carlise Borchardt e Douglas Moraes Machado por existirem e fazerem parte da minha caminhada. Vocês estiveram sempre me apoiando mesmo quando ao invés de ser uma fada sensata fui apenas uma doutoranda surtada.

Por fim a todas energias que podemos chamar como quisermos a qual denomino Deus, o responsável por reger cada passo da minha caminhada, obrigada.

EPÍGRAFE

*“O animal é tão ou mais sábio do que o homem:
conhece a medida da sua necessidade, enquanto
o homem a ignora.”*

DEMÓCRITO

*“Um homem só é nobre quando consegue sentir
piedade por todas as criaturas.”*

BUDA

RESUMO

CITRAL COMO ADITIVO NA RAÇÃO PARA PEIXES MARINHOS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES: ENZIMAS DIGESTIVAS E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E METABÓLICOS

AUTORA: Bruna Tomazetti Michelotti
ORIENTADOR: Bernardo Baldisserotto

Óleos essenciais, cujo composto majoritário é o citral, vêm apresentando bons resultados quando utilizados como aditivos na alimentação para peixes. Esse trabalho testou o citral na ração para três espécies, com três distintos hábitos alimentares, sendo elas: robalo (*Centropomus undecimalis*; carnívoro); tainha (*Mugil liza*; detritívora) e sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*; onívora). Os níveis utilizados foram: 0,0 (controle), 0,5, 1,0 e 2,0 mL de citral por kg de ração. O citral utilizado nas diferentes rações era uma mistura comercial contendo α -citral=60.15% e β -citral=39.85%. Os dois primeiros experimentos (robalo e tainha) tiveram um período de 45 dias de alimentação e não apresentaram mortalidade, mas com resultados muito distintos. Para o robalo, o citral na menor concentração foi prejudicial, sendo que o tratamento com 0,5 mL de citral por kg de ração apresentou o menor ganho de peso e taxa de crescimento específico, e a maior conversão alimentar. A atividade da pepsina foi significativamente maior no estômago dos robalos alimentados com 0,5 mL de citral por kg de ração e a atividade da amilase foi maior no intestino dos peixes alimentados com 1,0 mL de citral por kg de ração em comparação ao grupo controle. A atividade da lipase intestinal foi maior em todos os grupos alimentados com citral em comparação ao grupo controle. As atividades de quimotripsina e tripsina não mostraram diferença significativa entre os grupos. O maior nível de citral na dieta (2,0 mL de citral por kg de dieta) da tainha, levou a maior ganho de peso em relação ao tratamento controle. Os peixes alimentados com 2,0 mL de citral por kg de ração apresentaram maior atividade de pepsina no estômago e amilase no intestino que os peixes controle. No entanto, o citral adicionado na dieta não apresenta uma relação dose-resposta com nenhum dos parâmetros testados. O experimento conduzido com a sardinha-verdadeira em situação estressante devido às mudanças bruscas na luminosidade apresentou mortalidade em todos os tratamentos e teve uma duração de 20 dias. A sobrevivência foi maior nos tratamentos contendo citral. Apesar de melhorar a atividade de algumas enzimas digestivas, nenhum efeito benéfico da suplementação com citral foi observado no crescimento dessa espécie. Conclui-se que o citral age de forma diferente nas espécies testadas e recomendamos seu uso como aditivo na dieta para tainha e sardinha-verdadeira.

Palavras – chave: piscicultura marinha, citral, hábito alimentar, parâmetros zootécnicos

ABSTRACT

CITRAL AS ADDITIVE IN THE DIET FOR MARINE FISH WITH DIFFERENT EATING HABITS: DIGESTIVE ENZYMES AND ZOOTECHNICAL AND METABOLIC PARAMETERS

AUTHOR: Bruna Tomazetti Michelotti
ADVISER: Bernardo Baldisserotto

Essential oils whose major compound is citral have been showing good results when used as additives in fish feed. This work tested dietary citral supplementation for three species with three distinct feeding habits, namely: common snook (*Centropomus undecimalis*; carnivore); mullet (*Mugil liza*; detritivore) and Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*; omnivore). The levels used were: 0.0 - control, 0.5, 1.0 and 2.0 mL of citral per kg of feed. The citral used in the different diets was a commercial mixture containing α - citral = 60.15% and β - citral = 39.85%. The first two experiments (common snook and mullet) had a 45-day feeding period and did not show any mortality, however very different results. The citral at the lowest dietary insertion level was harmful to common snook, and at the end of the experimental period, the treatment with 0.5 mL of citral per kg of feed showed the lowest weight gain and specific growth rate and the highest feed conversion. Pepsin activity was higher in the stomach of fish fed 0.5 mL of citral per kg of feed and amylase activity was greater in the intestine of fish fed mL of citral per kg of feed compared to the control group. Intestinal lipase activity was higher in all groups fed with citral compared to the control group. Chymotrypsin and trypsin activities showed no difference between groups. The highest dietary citral level (2.0 mL of citral per kg of diet) for the mullet caused higher weight gain than the control treatment. Fish fed with 2.0 mL of citral / kg of feed showed greater pepsin activity in the stomach and amylase in the intestine than the control fish. However, dietary citral does not have a dose-response relationship with any of the tested parameters. The experiment conducted with the Brazilian sardine in a stressful situation due to the sudden changes in luminosity showed mortality in all treatments and lasted for 20 days. Survival was greater in treatments containing citral. Despite improving the activity of some digestive enzymes, no beneficial effect of supplementation with citral was observed in the growth of this species. It is concluded that citral acts differently in the species tested and we recommend its use as an additive in the diet for mullet and sardine.

Keywords: marine fish farm, citral, eating habit, zootechnical parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Robalo-flecha	14
Figura 2 -	Robalo-flecha pesando 6,725 kg	15
Figura 3 -	Tainha	18
Figura 4 -	Sardinha-verdadeira	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	ESPÉCIES	14
3.1.1	Robalo-flecha	14
3.1.2	Tainha	16
3.1.3	Sardinha-verdadeira	27
3.2	NUTRIÇÃO E PROCESSOS DIGESTIVOS	23
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E CITRAL	24
4	Artigo: Citral como aditivo na ração para robalo-flecha - parâmetros zootécnicos e enzimas digestivas	26
5	Manuscrito 1: Dietary citral supplementation for <i>Sardinella brasiliensis</i> zootechnical, histological and digestive enzymes parameters	43
6	Manuscrito 2: Growth, metabolic parameters and digestive enzymes of <i>mugil liza</i> fed dietary citral supplementation	62
7	DISCUSSÃO GERAL	82
8	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura marinha, de produção em grande escala, teve seu início por volta da década de 60 no Japão, com desenvolvimento de técnicas de alimentação, manejo e larvicultura (CERQUEIRA, 2004; COSTA-FILHO; FABREGAT; ROSA, 2013). No Brasil, iniciou-se no Nordeste no século XVII, onde juvenis de diversas espécies eram introduzidos em viveiros estuarinos abastecidos de água com a variação das marés (CERQUEIRA, 2004). Devido à extensa faixa costeira, o litoral brasileiro apresenta grande potencial ainda inexplorado para o cultivo de peixes marinhos em escala comercial, apesar da atividade estar em fase de desenvolvimento não evidenciando relevância econômica. A produção é baseada em instituições de pesquisa, fazendas experimentais (CAVALLI; HAMILTON, 2009; CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011; FAO, 2016) e alguns poucos produtores no litoral de São Paulo e Rio de Janeiro. As empresas existentes no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro possuem estrutura física e conhecimento técnico para a produção em grande escala de algumas espécies, assim como manter o fornecimento contínuo para os criadores de peixes. Essa atividade apresenta grande tendência de crescimento (COSTA-FILHO; FABREGAT; ROSA, 2013), pois a proporção de unidades populacionais de peixes marinhos exploradas em níveis biologicamente insustentáveis mundialmente aumentou de 10% em 1974 para 33,1% em 2015 (FAO, 2018).

Ao longo da costa brasileira são encontradas diversas espécies de peixes marinhos com características favoráveis para a aquicultura (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011). Até o início dos anos 2000, o desenvolvimento da atividade foi restringido pela falta de oferta de formas jovens (CERQUEIRA, 2004) e à grande deficiência de informações sobre a biologia e a tecnologia de cultivo (CAVALLI; HAMILTON, 2009). Para a maioria das espécies, estas características se mantêm até os dias atuais.

Cavalli e Hamilton (2009, 2011) destacam como espécies de grande potencial: robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), tainha (*Mugil liza*), sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) entre outras, especialmente devido à crescente demanda de peixes e à diminuição das reservas dos mesmos em todo o mundo. Diante disso, dietas completas e equilibradas com aditivos que ajudem a manter a saúde e melhorar o crescimento do peixe tornam-se uma alternativa para incremento da produtividade (GODA, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de citral na ração em relação a enzimas digestivas, parâmetros zootécnicos e metabólicos de peixes marinhos com diferentes hábitos alimentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a exposição de diferentes espécies de peixes marinhos a diferentes doses de citral incorporadas à ração, de modo a encontrar a melhor dose para as espécies testadas;
- Verificar a diferença da atividade de pepsina, tripsina, quimiotripsina, lipase e amilase no estômago e intestino no uso de uma mesma formulação para espécies de diferentes hábitos alimentares (*Centropomus undecimalis*, *Mugil liza* e *Sardinella brasiliensis*);
- Avaliar o efeito da exposição de robalos-flecha, tainha e sardinha-verdadeira a diferentes concentrações de citral sobre parâmetros zootécnicos: ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e fator de condição;
- Verificar se a exposição ao citral tem efeito sobre o metabolismo: glicose e lactato no fígado e músculo das espécies estudadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESPÉCIES

3.1.1 *Robalo-flecha*

Algumas espécies de peixe são apontadas como grandes candidatas para serem utilizadas na piscicultura marinha brasileira. Entre elas, destacam-se os robalos (Figura 1) por apresentarem características favoráveis ao cultivo, demonstrando grande potencial para a criação em cativeiro (FERRAZ et al., 2011; SOUZA, et al., 2011). Além disso, a criação destas espécies também é importante para a preservação dos recursos naturais, pois os juvenis podem ser utilizados em programas de repovoamentos (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010).

Figura 1: Robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*



Fonte: MICHELOTTI (2019).

Os robalos são peixes marinhos que fazem parte do gênero *Centropomus*, família Centropomidae e possuem características atrativas para a aquicultura (ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008; TAVARES; LUQUE, 2004): são peixes rústicos que se adaptam facilmente a variações nas condições ambientais e aceitam alimentação à base de ração, características que são favoráveis para o cultivo (ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008; BARROSO et al., 2002; JUNIOR et al., 2009; TSUZUKI, et al., 2009).

As espécies do gênero *Centropomus* estão distribuídas ao longo do continente americano (dos EUA até o sul do Brasil), nas costas dos oceanos Pacífico e Atlântico. Na América do Norte, Central e do Sul são encontradas doze espécies deste gênero (RIVAS, 1986). Na costa brasileira são quatro, das quais duas destacam-se como mais predominantes: *C. parallelus* (robalo-peva) e *C. undecimalis* (robalo-flecha) (RIVAS, 1986).

Os robalos possuem hábito alimentar carnívoro com dieta composta, preferencialmente, por crustáceos, contudo são considerados predadores oportunistas que variam a alimentação de acordo com a disponibilidade de alimento (TSUZUKI, et al., 2009). A dieta fica mais piscívora à medida que os peixes crescem. Em relação ao habitat, Cerqueira (2004) relata que os robalos são peixes costeiros que realizam deslocamentos constantes entre água salgada e água doce. São considerados peixes marinhos, mas que em suas diferentes fases de vida adentram estuários e rios de água doce (RIVAS, 1986), habitando profundidades de até 40 metros (ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008). Os locais de reprodução são geralmente em praias e desembocaduras de rios, ocorrendo a necessidade de água salgada para desova, porém a maturação sexual pode ser realizada em água doce (CERQUEIRA; MIOSO; CANARIN, 2005).

O robalo-flecha atinge um tamanho máximo entre 120 a 140 centímetros e pesam entre 20 a 23 kg (ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008), sendo que o tamanho comercial dessas espécies é de 0,5 a 2 kg. O crescimento inicial normalmente é baixo, sendo necessários aproximadamente seis meses, em condições de clima tropical, para os juvenis de 1,5 a 3,0 gramas crescerem até um peso aproximado de 30 gramas (CERQUEIRA; MIOSO; CANARIN, 2005).

Figura 2: Robalo-flecha pesando 6,725 kg.



Fonte: MICHELOTTI (2019).

As informações referentes à engorda de robalo-peva encontradas na literatura são basicamente avaliações de diferentes sistemas de produção, extensivos e intensivos, relatados por Cerqueira (2005). No sistema extensivo, os robalos podem ser utilizados como controladores da procriação indesejável de outros peixes. A utilização de um robalo-peva (8

cm e 10 g) para cada tilápia (100 g) em tanque escavado com água doce produziu peixes com 65 g após oito meses, com sobrevivência de 40 a 70% (ESQUIVEL; ESQUIVEL, 2002). Em um sistema mais intensivo, 15.000 juvenis de robalo-peva foram estocados em um viveiro de camarão de 1 ha com água marinha e no final a sobrevivência estimada foi de 90 % e o peso de 192 g (Empresa Compescal, Aracati, CE). Em outro teste com densidades mais elevadas, foram obtidos peixes com peso final entre 300 e 400 g e sobrevivência de 80% após 21 meses de cultivo utilizando a densidade de aproximadamente 80 peixes por m³. O cultivo em tanque-rede seria outra opção no cultivo intensivo, inclusive com um custo menor de implantação. Ostini et al (2007) avaliaram o desempenho produtivo na criação de juvenis de robalo-peva (32,53 ± 6,54 g) com uma densidade de 20 e 40 peixes m⁻³ durante 60 dias. As médias de pesos finais, taxa de crescimento específico e ganho de peso diário indicaram que o tratamento de menor densidade foi superior ao de maior densidade. Em relação ao ganho de peso total, observou-se um incremento de 98,6 e 87,9g para as densidades de 20 e 40 peixes m⁻³. Michelotti et al. (2018) afirmam que juvenis de robalo-flecha possuem um bom crescimento em água doce com dureza entre 100 e 500 mg CaCO₃ L⁻¹, o que nos remete a novas formas de cultivo dessa espécie. Resultados na água doce também foram relatados por Cerqueira (2005), em que o cultivo em açudes, com baixa densidade e recebendo alimento natural, produziu, após dois anos, peixes com cerca de 300-500 g, e após quatro anos, fêmeas maduras de robalo-peva com 4,5 kg. Outra forma de criação de citada pelo mesmo autor é a possibilidade de povoamento em canais de abastecimento em tanques de tratamento de efluentes nas fazendas de camarões, sendo que sua presença diminui a frequência de competidores e predadores dentro dos viveiros. Nesse sistema foi possível obter em 12 meses robalos com 24 cm e 155 g com sobrevivência de 70%.

A tecnologia para a produção de juvenis de robalo em laboratório tem um bom desenvolvimento no que diz respeito à reprodução, larvicultura, manejo e alimentação, entre outros (ALVAREZ-LAJONCHEGRE et al., 2002; ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008; MICHELOTTI et al., 2018). Entretanto, não há registros sobre a criação em escala comercial dessa espécie no Brasil (FARIAS et al., 2017). No Rio Grande do Norte (Mossoró), em tanque de camarão, 1500 juvenis de robalo-flecha (0,5 g) produzidos em laboratório agiram no controle da população de tilápias (0,5 g), chegando a 745 g em oito meses (SILVA JÚNIOR, 2016).

A qualidade da carne dos robalos é excelente para a culinária. Com a aparência branca e pouca gordura, possui um elevado valor de mercado, pois reúne características organolépticas muito procuradas pelos consumidores (FERRAZ et al., 2011; MEDEIROS

FERRAZ; CERQUEIRA, 2018; SOUZA et al., 2011; TAYLOR; GRIER; WHITTINGTON, 1998). A separação do filé é fácil, com rendimento de 45%, considerado alto em comparação com outras espécies, e sem espinhas intramusculares. A demanda é superior à oferta, uma vez que não são extraídos em grande quantidade, pois não formam cardumes grandes e não possuem importância na pesca industrial (TSUZUKI; BERESTINAS, 2008). O preço de venda do robalo está acima do valor do salmão e da maioria das demais espécies comercializadas (CORREA; CERQUEIRA, 2008).

As exigências nutricionais dos robalos não foram totalmente determinadas e as informações ainda não são suficientes para se estabelecer dietas adequadas. Contudo, é importante considerar que as dietas formuladas devem apresentar características relacionadas com seu hábito alimentar carnívoro, necessitando de uma alta concentração de proteína para formar órgãos e tecidos, além de lipídeos como fonte de energia, uma vez que não aproveitam de forma eficiente os carboidratos (COSTA-FILHO; FABREGAT; ROSA, 2013). No caso de juvenis de robalo-flecha é aconselhável que o nível mínimo de proteína bruta seja de 40% (GRACIA-LOPEZ, 2003). Entretanto, esse valor é variável conforme as condições ambientais ou/e de cultivo, visto que segundo Concha-Frías et al. (2018) a exigência proteica de dessa espécie apresentou alterações conforme a salinidade. Na salinidade de 35, o peixe com 3 g atinge maior peso com teor protéico mínimo de 45%, mas em salinidade 5, a exigência aumenta para 60 % de proteína.

Na falta de dietas específicas em situações práticas de cultivo, normalmente são fornecidas rações de outras espécies carnívoras, pois apresentam maiores semelhanças com as exigências nutricionais dos robalos (CERQUEIRA et al., 2020).

O robalo é pouco exigente em relação ao oxigênio dissolvido, provavelmente devido ao seu comportamento calmo. Concentrações próximas da saturação, em torno de 5-6 mg/L para 25 °C e salinidade de 35 são consideradas mais adequadas (CERQUEIRA, 2020). Segundo o trabalho de Silva (2016) com robalo-flecha, a temperatura ótima para a espécie é de 31,9 °C.

3.1.2 Tainha

As espécies do gênero *Mugil* pertencem à família Mugilidae. A tainha *Mugil liza* é encontrada desde o estado do Rio de Janeiro, no Brasil, até a Argentina (DURAND et al., 2012; FROESE; PAULY, 2008; LEMOS et al., 2014; MENEZES; OLIVEIRA; NIRCHIO, 2010). São peixes catádromos, seus juvenis deslocam-se das regiões costeiras para águas

estuarinas e lagunares, ricas em alimento, onde passam sua fase de crescimento e na época de desova migram para o mar (ALBIERI; ARAÚJO, 2010; LEMOS et al., 2014; VIEIRA; SCALABRIN, 1991; VIEIRA, 1991). No Rio Grande do Sul é frequente a presença de juvenis ao longo do ano no estuário da Lagoa dos Patos (VIEIRA; SCALABRIN, 1991).

O gênero teve o seu status taxonômico revisado (DURAND et al., 2012; FRAGA et al., 2007; MENEZES; OLIVEIRA; NIRCHIO, 2010), Fraga et al. (2007) sugeriram que *M. liza* e *M. platanus* poderiam ser consideradas uma só espécie, ou consideradas como famílias da *M. cephalus* (espécimes coletados no Chile). Menezes et al. (2010), analisando merística e morfometricamente espécimes coletados do Uruguai e Argentina até a Venezuela, sugeriram que nesta região existe somente uma espécie, denominada *M. liza*, e que não podem ser consideradas *M. cephalus*. Logo, durante esse trabalho consideraremos *M. platanus*, e *M. liza* uma mesma espécie: *M. liza*.

A dieta dos mugilídeos é notoriamente diversa incluindo uma grande capacidade de adaptação a alimentos de diferentes origens, além disso, seus hábitos alimentares variam de acordo com a fase do ciclo de vida. São considerados detritívoros, iliófagos (SILVA, 1980; VIEIRA, 1991), zooplactófagos (SILVA, 1980), onívoros (CERVIGÓN, 1993) e fitófagos (FRANCO; BASHIRULLAH, 1992; SILVA, 1980). A tainha, no sul do Brasil, pode atingir cerca de 1m de comprimento, com peso em torno de 6 kg (VIEIRA; SCALABRIN, 1991). Mudanças e particularidades dos ambientes físicos podem influenciar a ecologia alimentar de juvenis de tainhas (BLABER, 1987). Em localidades onde a plataforma continental é mais larga e as praias possuem caráter dissipativo, juvenis de mugilídeos têm menos dependência de ambientes estuarinos, podendo fazer a transição do habito alimentar de zooplactófago para iliófago no ambiente marinho costeiro (BLABER, 1987), como é o caso de *M. liza* na costa sul do Brasil (VIEIRA, 1991).

Figura 3: Tainha, *Mugil liza*



Fonte: MICHELOTTI (2019).

Uma vez que a tainha adota o hábito alimentar iliófago (PILLAY, 1953; SILVA; WIJEYARATNE, 1977), este permanece até o estágio adulto. Sua estratégia alimentar permite, então, a ingestão de diversos itens como plantas, detritos (BRUSLE, 1981; ODUM, 1970), microalgas (ALMEIDA et al., 1993; LAFFAILLE et al., 2002), meiofauna (LAFFAILLE et al., 1998), muitos deles com um alto grau de indigestibilidade. As partículas de sedimento ingeridas auxiliariam o processamento mecânico da digestão de diatomáceas e restos vegetais (VIEIRA, 1991). Esse processo mecânico também acontece pela presença de uma região pilórica com espessa musculatura e superfície triturante como uma moela (GALVÃO et al., 2018). Odum (1970) sugere que as bactérias e protozoários sobre as partículas de detritos ingeridos podem ser importantes como uma fonte essencial de nutrientes e, sobretudo, pela participação na decomposição de material vegetal. Com transições de hábito alimentar durante as fases de vida e de hábito iliófago quando adultas, com grande ingestão de material vegetal, as tainhas estão entre os poucos peixes de médio e grande porte capazes de se alimentar sobre níveis tróficos baixos (GAUTIER; HUSSENOT, 2005; LAFFAILLE et al., 2002), desempenhando um papel importante nas cadeias alimentares costeiras (LAFFAILLE et al., 2002; LEFEUVRE; LAFFAILLE; FEUNTEUN, 1999; MENEZES et al., 2015).

O cultivo de tainhas é uma realidade em várias regiões do mundo, sendo o Egito, atualmente, o maior produtor de *M. cephalus*. No Brasil, as tainhas ou paratis possuem grande importância na pesca comercial e estão associadas historicamente à subsistência e à cultura de comunidades de pescadores artesanais em regiões costeiras (REIS; D'INCAO, 2000). A tainha tem uma carne considerada saborosa, a gônada feminina da mesma (ova) é conhecida como "caviar" brasileiro e bastante apreciada no Brasil e em países como Taiwan, França, Grécia, Itália e Espanha (FERREIRA et al., 2006). O IBAMA classificou a tainha, no ano de 2004, como sobre-explorada e desde 2007 a captura vem apresentando uma redução gradativa (MDIC, 2017). No Brasil, em 2014, foi categorizada como espécie quase ameaçada de extinção (NT) e, segundo a International Union for Conservation of Nature (IUCN), passa por avaliação de seu estado de conservação populacional para definição de estratégias de manejo e ordenamento pesqueiro (MPA 2015). Hoje, o esforço de pesca consiste em 60 traineiras autorizadas, e conforme o Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Tainha *M. Liza*, no sudeste e sul do Brasil, do ano de 2015, a frota apresenta-se acima do nível sustentável. Por outro lado, a espécie apresenta características que a qualificam como uma alternativa para a piscicultura, tais como: ampla tolerância à salinidade (0 a 90) e à temperatura (3 a 36 °C), elevada robustez e fácil manejo alimentar, pois aceita com facilidade a dieta inerte

(CERQUEIRA, 2004; MIRANDA-FILHO et al., 2010; SAMPAIO; WASIELESKY; MIRANDA-FILHO, 2002; SAMPAIO; FERREIRA; TESSER, 2001). Além de sua importância econômica para a pesca, a tainha *M. Platanus* apresenta características que a qualificam como uma alternativa para a piscicultura nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Esta espécie é eurialina e euritérmica (GODINHO, 2005), suporta bem condições de confinamento, aceita com facilidade alimentos artificiais e é possível que sua produção seja feita em sistemas de mono e policultivo com outras espécies de peixes e crustáceos (BENETTI e FAGUNDES NETTO, 1983; SAMPAIO et al., 2001). Podem atingir cerca de 1 m de comprimento e 6 kg de peso, sendo comuns exemplares de 50 cm (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; OLIVEIRA; SOARES, 1996).

A reprodução de *M. liza* ocorre do final de outono ao início de inverno (maio a agosto), com pico em maio e junho. A desova acontece em mar aberto, entre o norte do Rio Grande do Sul e São Paulo, com temperatura da água de 19 a 21 °C (CERQUEIRA et al. 2017). De acordo com Benetti e Fagundes (1980), em 1979, no Rio de Janeiro, começaram estudos que abordavam a reprodução controlada em laboratório e larvicultura de *M. liza*. Os estudos seguiram e posteriormente foram publicados em Santa Catarina por Andreatta e colaboradores (1981), e em São Paulo por Godinho e colaboradores (1993). Contudo, nenhum deles conseguiu estabelecer a criação comercial da espécie (CERQUEIRA et al., 2017). Em 2014 as pesquisas sobre reprodução controlada desta espécie foram retomadas (PASSINI et al., 2015). O tempo de larvicultura é entre 45 a 60 dias, com juvenis de 20 a 30 mm de comprimento, tendo as nadadeiras formadas e o corpo coberto com escamas. São resistentes e podem ser estocados em viveiros para engorda, com taxas de sobrevivência de no máximo 20% (CERQUEIRA et al., 2017).

Estudos sobre a susceptibilidade de juvenis de *M. platanus* a fatores potencialmente limitantes para sua criação foram realizados. Miranda-Filho, Wasielesky-Jr e Maçada (1995) avaliaram o efeito da amônia e do nitrito sobre o crescimento da tainha concluindo que seu organismo é passível de ser aproveitado em sistemas de cultivo desde que os níveis de amônia total sejam inferiores a 4 mg L⁻¹, visto que o desenvolvimento é reduzido em concentrações superiores a esta. Neto e Spach (1999) propuseram um protocolo para criação destes peixes em água doce. Sampaio et al. (2001) sugerem uma densidade de estocagem entre três a cinco juvenis por litro em cultivo de laboratório. A toxicidade aguda da amônia e do nitrito para juvenis de tainha é maior em água doce que em salinidades mais elevadas (SAMPAIO; WASIELESKY; MIRANDA-FILHO, 2002). Okamoto et al (2006) observaram que elas crescem melhor em temperaturas de 30 °C.

O desenvolvimento do trato digestório das larvas de tainha foi considerado lento e a substituição de organismos vivos por dietas artificiais só é possível ao redor do 40° dia após a sua eclosão, quando o trato digestório se torna completamente funcional, com a diferenciação do estômago e o aparecimento de glândulas gástricas. Larvas de *M. platamus* com quatro dias de vida já apresentam as enzimas tripsina e carboxipeptidases, embora suas atividades proteolíticas sejam baixas em relação aos juvenis (GALVÃO et al., 2018).

3.1.3 Sardinha-verdadeira

A sardinha faz parte de um grupo denominado peixes pelágicos subtropicais, uma vez que possui hábitos costeiros. Esses peixes classificam-se em três gêneros e dezoito espécies que estão distribuídas pelo mundo, mas restritas às latitudes 60° N e 50° N (SCHWEIGERT, 2002) mesmo que essas espécies sejam de água quente. O gênero *Sardinella* está presente nos dois lados do oceano Atlântico, bem como no Indopacífico. Porém, a sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, geograficamente, está isolada dos outros grupos do gênero no oceano Atlântico (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

A sardinha-verdadeira é uma espécie marinha encontrada na área entre Cabo de São Tomé /- Rio de Janeiro (22° S) e Cabo de Santa Marta /- Santa Catarina (29° S) (JABLONSKI, 2007), sendo capturada (DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010) e tendo grande importância ecológica e comercial no sul e sudeste do Brasil. Os peixes adultos são utilizados para consumo humano e os juvenis são utilizados como isca-viva na captura de atum (ANDRADE; SANTOS, 2004; DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010; SENINA; SIBERT; LEHODEY, 2008). A sardinha-verdadeira, juntamente com outras *Sardinella* spp, responde por 5% da produção mundial de peixes marinhos, mas representa uma proporção muito maior do valor total das capturas (FAO, 2016).

Figura 4: Sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*



Fonte: V. MENDONÇA (2019).

As capturas comerciais da sardinha no Brasil começaram no final da década de 1950 e tiveram rápido crescimento na década de 1960, atingindo um pico de 228.000 toneladas em 1973 (CERGOLE; SACCARDO; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 2002). No entanto, em 2014, a captura foi de apenas 51.781 toneladas (FAO, 2016). Este declínio pode ser atribuído a uma combinação de pesca excessiva e condições ambientais (CERGOLE; SACCARDO; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 2002). Contudo, considerando sua importância econômica, um dos esforços que poderiam minimizar os efeitos colaterais do colapso da população brasileira de sardinha é sua produção em cativeiro (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

Considerando a importância econômica, em 1950 iniciaram-se os primeiros estudos sobre a sardinha, mas apenas recentemente o foco voltou-se para a aquicultura (BALOI, M. et al., 2016). O ciclo de vida deste peixe é curto (longevidade de no máximo quatro anos) e apresenta alta taxa de crescimento e fecundidade (PERIN; VAZ-DOS-SANTOS, 2014), sendo, portanto, uma boa alternativa para a aquicultura. Essa espécie apresenta comportamento alimentar diurno na natureza, alimentando-se de fito e zooplâncton por toda a sua vida (KURTZ; MATSUURA, 2001; SCHNEIDER; SCHWINGEL, 2000).

A *Sardinella brasiliensis* pertence a um grupo de peixes onívoros de pequeno porte, de corpo lateralmente comprimido, prateado e com pequena amplitude de comprimento (tamanho máximo de 270 mm). Formam cardumes em águas costeiras, além disso, entram em baías e estuários (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

A alimentação da referida espécie vai se modificando conforme as fases de desenvolvimento. A dieta de larvas e juvenis (13-65 mm) é composta por pequenos copépodes dos gêneros *Oncaea*, *Calanus*, *Euterpina* e *Corycaeus*, diatomáceas como *Coscinodiscus*, *Paralia*, *Triceratium*, *Melosira*, *Navicula* e *Pleurosigma* e dinoflagelados como *Peridinium* e *Ceratium* (MONTES, 1953). Os náuplios de copépodes constituem o item mais importante, seguido por ovos de invertebrados, copepoditos e copépodes adultos (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Com o desenvolvimento, aumenta-se o espectro alimentar, os pré-adultos e adultos apresentam flutuações sazonais nas dietas. No outono e na primavera sua presa predominante é o zooplâncton (74,2% do volume alimentar), já no inverno o fitoplâncton passa a representar 66% da sua dieta (SCHNEIDER; SCHWINGEL, 2000).

Em cativeiro, para melhores resultados de ganho de peso de juvenis, foi determinado um regime alimentar de 5,45% do peso vivo (BALOI et al., 2017) e a frequência alimentar de duas vezes ao dia (BALOI et al., 2016). Sterzelelecki et al (2017) fizeram um ensaio experimental testando diferentes relações carboidrato/lipídio para sardinha-verdadeira e descobriram que altas inserções de carboidrato na alimentação de juvenis da espécie inibem o consumo de ração. Entretanto, o lipídio corporal aumentou com o aumento do lipídio da dieta e foi inversamente correlacionado à umidade do corpo. Os autores concluíram que a relação ótima de carboidrato/lipídio para ganho de peso máximo de juvenis de sardinha-verdadeira pode ser estimada em 3,41, contendo aproximadamente 300 g kg⁻¹ carboidrato e 88 g kg⁻¹ lipídio (STERZELECKI et al., 2017). Esse mesmo grupo de estudos estimou que o nível ideal de proteína na ração para *S. brasiliensis* é de 366,7 g kg⁻¹ (STERZELECKI., 2018).

3.2. NUTRIÇÃO E PROCESSOS DIGESTIVOS

A grande diversidade ecológica e filogenética dos teleósteos se reflete nas variadas formas que estes peixes obtêm alimentos, bem como, na multiplicidade de suas dietas. A maioria apresenta certa flexibilidade em seus hábitos alimentares, que podem variar de acordo com a disponibilidade dos diferentes nutrientes no ambiente (BLAY; AWITTOR; AGBEKO, 2006; DÍAZ et al., 2003). As estruturas dos vários órgãos do trato digestório estão, portanto,

diretamente relacionadas à natureza do alimento e à maneira como ele é ingerido, de modo que haja eficácia nesta ingestão (CHAVES; VAZZOLER, 1984).

Em peixes, os processos digestórios e as enzimas são semelhantes ao observado em outros vertebrados. A síntese e níveis apropriados de enzimas digestivas são regulados pela disponibilidade de nutrientes no ambiente, entre outros, os quais variam ao longo do tempo (LÓPEZ-VÁSQUEZ; CASTRO-PÉREZ; VAL, 2009). Os peixes são geralmente classificados de acordo com os hábitos alimentares, e espera-se que as atividades enzimáticas digestivas reflitam seus hábitos alimentares e dieta (FERNANDEZ et al., 2001; LANGELAND; LINDBERG; LUNDH, 2013). Compreender a relação entre as atividades enzimáticas digestivas e a composição centesimal dos alimentos ingeridos pelos peixes no meio ambiente é importante para a compreensão da biologia alimentar das espécies (ALMEIDA et al., 2018).

O uso de aditivos na ração tem sido utilizado para animais terrestres e aquáticos, visando controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo e, assim, proporcionar a melhora dos índices zootécnicos (NUNES et al., 2012; SANTOS; LUDKE; LIMA, 2009). Também podem apresentar efeitos positivos na digestão e comunidade microbiana intestinal (BENTO et al., 2013; BRENES; ROURA, 2010; FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010; GIANNENAS et al., 2013; ZENG et al., 2015). Também um fator chave relacionado à aplicabilidade do uso de alimentos pelo peixe é o período que leva para passar pelo trato digestório. Isso é comumente referido como tempo de trânsito gastrointestinal e tem uma influência direta na eficiência da digestão e na absorção de nutrientes devido ao tempo que o alimento é exposto aos processos digestivos (NRC, 2011; JOBLING, 1987; WINDELL, 1968).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E CITRAL

A partir da década de 80 houve um aumento substancial na pesquisa e uso de óleos essenciais como aditivos para alimentos para não-ruminantes (BRENES; ROURA, 2010; FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010; ZENG et al., 2015). Entretanto, a pesquisa sobre óleos essenciais ou seus compostos isolados como suplementos dietéticos para espécies aquáticas é mais limitada e recente (SUTILI et al., 2017).

Extratos e óleos essenciais possuem diversos compostos ativos como fenóis, polifenóis, alcaloides, quinonas, terpenoides, lectinas e polipeptídeos, estabelecendo-se como alternativas eficazes frente aos aditivos convencionais (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; HEO, 2011). Esses compostos são comumente reconhecidos como

seguros para o consumo animal e meio ambiente por possuírem efeitos colaterais ou toxicidade reduzidos e melhor biodegradabilidade (KALEMBA e KUNICKA, 2003). Muitos mecanismos de ação benéfica têm sido propostos no uso de óleos essenciais na dieta de peixes, como aumento de crescimento, aumento da deposição de proteínas musculares, melhora no estado oxidativo e resistência a doenças, diminuição da resposta ao estresse (ZEPPENFELD et al., 2016; ZHENG et al., 2009).

O citral, mistura de dois tautômeros: neral (Z-citral ou α -citral) e geranial (E-citral ou β -citral), consiste em um componente de óleos essenciais extraídos de diversas plantas, tais como capim-limão (*Cymbopogon citratus*), melissa (*Melissa officinalis*), verbena (*Verbena officinalis*), erva-cidreira (*Lippia alba*), erva-lúisa (*Aloysia triphylla*), entre outras. Na prática é utilizado como aditivo alimentar e como fragrância em cosméticos, devido ao seu agradável aroma de limão. Biologicamente, este constituinte já foi relacionado às atividades sedativa (VALE, DO et al., 2002), antifúngica (FERREIRA, T. M. et al., 2009) e anti-inflamatória (BACHIEGA; SFORCIN, 2011; PONCE-MONTER et al., 2010), tendo sido detectados, também, efeitos antinociceptivos (ORTIZ et al., 2010) e mais recentemente um promissor efeito anestésico (SOUSA et al., 2015). Zhang et al. (2014) demonstraram a capacidade do citral de inibição da formação de biofilme de bactérias, indicando que esta substância apresenta potencial de uso como conservante alimentar. Silva-Angulo et al (2015) reforçaram a hipótese de que o citral possui propriedades antibacterianas, tendo em vista que este monoterpeneoide exibiu atividade contra *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes*.

Citral é o principal composto do óleo essencial de *A. Triphylla* (α -citral 29,41 % e β -citral 20,78 %), cuja utilização como aditivo na ração melhorou o crescimento e o estado oxidativo do jundiá, *Rhamdia quelen* (SANTOS et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2016). A suplementação dietética com óleo essencial microencapsulado de *Cymbopogon Flexuosus*, que também possui citral como composto principal (α -citral 45,7% e β -citral 32,1%), aumentou o rendimento de carcaça e deposição de proteína em jundiá (RAMPELOTTO et al., 2018). O citral encapsulado apresentou potencial de uso como suplemento dietético para tratar infecções na produção animal (YANG et al., 2016).

4 ARTIGO 1 – aceito no periódico científico Ciência Rural

Citral as food additive for common snook – zootechnical parameters and digestive enzymes

Citral como aditivo na ração para robalo-flecha parâmetros zootécnicos e enzimas digestivas

Bruna Tomazetti Michelotti^I, Natacha Cossetin Mori^{II,III}, Caio Cesar Franca Magnotti^{IV}, Berta Maria Heinzmann^{II,V}, Ana Paula Gottlieb Almeida^{VI}, Vinicius Ronzani Cerqueira^{IV}, Bernardo Baldisserotto^{I,VI*}

ABSTRACT

Essential oils of plants whose main compound is citral showed beneficial effects when added to fish feed. The objective of the present study was to evaluate the dietary effect of the addition of citral on zootechnical parameters and digestive enzyme activities of *Centropomus undecimalis*. Juveniles were fed for 45 days with diets containing different amounts of citral (0.0 - control, 0.5, 1.0, and 2.0 mL per kg of diet). The water quality parameters were kept stable during the experiment and no mortality was observed. At the end of the experimental period, the treatment 0.5 mL citral per kg of diet had the lowest weight

^I Graduate Program in Animal Husbandry, Federal University of Santa Maria/ UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^{II} Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria/ UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^{III} Department of Health and Agricultural Sciences, University of Cruz Alta/UNICRUZ, Rodovia Municipal Jacob Della Méa, s/n, 98020-290, Cruz Alta, RS, Brazil

^{IV} Marine Fisheries Laboratory, Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, 88061-600, Florianópolis, SC, Brazil

^V Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^{VI} Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. *Author for correspondence.

gain and specific growth rate, and the highest feed conversion, while the same parameters did not differ between the other treatments. Pepsin activity was higher in the stomach of fish fed 0.5 mL citral per kg of diet and amylase activity was higher in the intestine of fish fed 0.5 and 2.0 mL citral per kg of diet compared to the control group. Intestinal lipase activity was higher in all groups that were fed citral compared to the control group. Chymotrypsin and trypsin activities showed no difference between groups. Consequently, dietary addition of citral at any of the levels tested is not recommended for common snook.

Key words: *Centropomus undecimalis*, amylase, pepsin, lipase, growth, marine fish farming.

RESUMO

Óleos essenciais de plantas cujo composto majoritário é o citral mostraram efeitos benéficos quando adicionados à ração para peixes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de citral sobre os parâmetros zootécnicos e atividades das enzimas digestivas de *Centropomus undecimalis*. Os juvenis foram alimentados por 45 dias com dietas contendo diferentes quantidades de citral (0,0 - controle, 0,5, 1,0 e 2,0 mL por kg de ração). Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos estáveis durante o experimento e nenhuma mortalidade foi observada. Ao final do período experimental, o tratamento 0,5 mL citral por kg de ração teve o menor ganho de peso e taxa de crescimento específico, e a maior conversão alimentar, enquanto os mesmos parâmetros não diferiram entre os demais tratamentos. A atividade da pepsina foi maior no estômago de peixes alimentados com 0,5 mL de citral por kg de ração e a atividade de amilase foi maior no intestino de peixes alimentados com 0,5 e 2,0 mL citral por kg de ração comparado ao grupo controle. A atividade da lipase intestinal foi maior em todos os grupos que foram alimentados com citral em comparação ao grupo controle. As atividades de quimotripsina e tripsina não mostraram diferença entre os grupos.

Consequentemente, a adição de citral na ração em qualquer um dos níveis testados não é recomendada para robalo-flecha.

Palavras-chave: *Centropomus undecimalis*, amilase, pepsina, lipase, crescimento, piscicultura marinha.

INTRODUCTION

Common snook, *Centropomus undecimalis*, is a carnivore with several characteristics that qualifies it as a marine species for intensive fish farming, since it has high market value, is well adapted to captivity, easily accepts inert foods and has a good feed conversion ratio (RHODY et al., 2014; TUCKER JR, 1987). In addition, it is an important fish for sport fishing in the American continent (LOWERRE-BARBIERI; VOSE; WHITTINGTON, 2003).

The search for the maximum food efficiency has promoted the use of dietary additives to control harmful agents to the digestive process and thus improve the zootechnical indexes. Several essential oils (EOs) have been used as dietary additives for fish, improving growth and resistance to diseases (ZHENG et al., 2009; FERREIRA et al., 2014; SÖNMEZ et al., 2015; MOHAMADI SAEI et al., 2016; BRUM et al., 2017; ZEPPENFELD et al., 2016, 2017).

Citral is the main compound of *Aloysia triphylla* EO (essential oil), whose dietary addition improved growth and oxidative status of silver catfish, *Rhamdia quelen* (ZEPPENFELD et al., 2016, 2017). Dietary supplementation with the microencapsulated EO of *Cymbopogon flexuosus*, which also has citral as the main compound, increased carcass yield and protein deposition in silver catfish (RAMPELOTTO et al., 2018). Often the major EO component is primarily responsible for its biological activities, but dietary supplementation with citral did not improve oxidative parameters and innate immunity in

common snook (MORI et al., 2019). However, the effect of citral on growth and digestive enzymes activity in this species was not studied, then the objective of the present study was to evaluate the efficacy of dietary supplementation with citral as a growth promoter of common snook and to analyze its effects on digestive enzymes activities.

MATERIAL AND METHODS

Animals and rearing conditions

The experiments were performed in the Marine Fish Culture Laboratory (LAPMAR) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Juvenile common snook *Centropomus undecimalis* (initial weight 2.75 ± 0.02 g and total length 7.75 ± 0.01 cm) were obtained by induced spawning of broodstocks as described by PASSINI et al. (2013) and maintained at the LAPMAR in salinity 35 ppt.

Juveniles were randomly distributed in four water recirculation systems with salinity 31.12 ± 2.31 ppt and temperature of 31.59 ± 0.91 °C as suggested by MICHELOTTI et al. (2018) (n=30 per tank). Each recirculation system consisted of three circular tanks (150L). The water contained in these experimental units was removed through a central pipeline with a bag filter (50µm), a biological filter, a foam fractionator and an ultraviolet sterilizer (60w). After the treatment, the water returned to the experimental tanks.

The fish were acclimated for four days to the experimental feed. Remains of food and feces were removed daily through siphoning, and an average of 25% of the water was renewed.

Water parameters

The water parameters were checked daily (temperature, pH and dissolved oxygen) or weekly (alkalinity, total hardness, ammonia and nitrite) throughout the experimental period, as

described by MICHELOTTI et al. (2018). The water parameters remained stable during the experiment, with no significant difference between treatments (Table 1).

Citral

Citral (α -citral=60.15%, β -citral=39.85%) was obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA). The quantification of the isomers was executed in an Agilent 6890A gas chromatography coupled with a 5973 mass selective detector using a HP-CHIRAL capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness) and electron ionization mode at 70 eV. Helium was used as carrier gas in a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injector temperature was set at 250°C and detector at 280°C. Oven temperature was kept at 40 °C for 4 min and raised to 240°C at a rate of 4 °C min⁻¹. Sample solutions of 1 μ L (2:1000 in hexane, v/v) were injected in splitless mode. Kovats retention indices were calculated using a homologous series of C8-C40 n-alkanes injected under the same conditions of the samples. The isomers were identified by mass spectra and Kovats retention index comparison with data from the National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Library (NIST). Compounds relative percent was estimated by under peak area integration obtained from the chromatogram.

Diets and experimental design

Four diets based on the same initial formulation (MORI et al., 2019) were produced, dried in an oven at 40°C and subsequently pelleted at 6 mm (Table 2). Different amounts of citral (0-control, 0.5, 1.0, 2.0 mL per kg of diet) were added to the mixture together with fish oil prior to the drying and pelletizing processes. Fish received the experimental diets to apparent satiety four times a day (9 a.m. and 1, 3 and 6 p.m.) for 45 days. The feed was suspended 24 h prior to sampling and final collection of the experiment. The experimental design resulted in four groups (in triplicate).

Samples

After 45 days, three fish from each tank (n = 9 animals per treatment) were anesthetized with 50 mg L⁻¹ of benzocaine and euthanized by sectioning of the spinal cord. Stomach and intestine were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissues were stored at -20 °C for further analysis.

Zootechnical Parameters

At 1, 22 and 45 days of experiment all common snooks were anesthetized with 50 mg L⁻¹ benzocaine, measured and weighed to calculate weight gain (Wg), specific growth rate (SGR) and feed conversion (FC) as described by MICHELOTTI et al. (2018). Condition factor (FK) was calculated by the following equation: $(FW/FL^3)*100$, where FW is the final weight and FL is the final length.

Digestive enzymes

Samples from stomach, anterior and posterior intestine were homogenized in an ice bath at ratio 1:10 (tissue: homogenization buffer) with an Ultraturrax. The homogenization buffer solution was composed by 20 mM Tris/10 mM phosphate, pH 7.0 in 50% (v/v) glycerol. The extract was centrifuged and supernatant was utilized in assays as enzyme source.

Amylase activity was assayed in 0.2 M phosphate-citrate buffer, pH 7.0, 0.5% NaCl with a starch concentration of 2.5%. The reaction was stopped by adding Ba(OH)₂ 0.3 N and ZnSO₄ 5%. The experimental protocol was modified according to BERNFELD & COLOWICK (1955). The determination of starch hydrolysis was done following PARK & JOHNSON (1949). The absorbance was recorded at 660 nm. One unit of enzyme was defined as 1 mmol of glycosyl-glucose released from starch per min per mg of protein.

Lipase activity was assayed as described by GAWLICKA et al. (2000) and Chymotrypsin and trypsin assay was performed according HUMMEL (1959). Pepsin activity was assayed as described by HIDALGO et al. (1999). Enzyme activities were calculated as described by ALMEIDA et al. (2018).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm error. The Levene's test was performed to evaluate the homogeneity of variances of the data. Comparisons among treatments were made by one-way ANOVA followed by Tukey's test. All analyses were performed using Statistica Software 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Zootechnical parameters

Dietary addition of citral did not change significantly WG and FC compared to the control group at 22 days, but WG was lower and FC higher in fish fed 0.5 mL citral per kg of feed than in those fed 1.0 mL citral per kg of feed. At the same day the lowest SGR and FK were observed in fish fed 0.5 mL citral per kg of feed. After 45 days the lowest WG and SGR and the highest FC were observed in fish fed 0.5 mL citral per kg of feed (Table 3).

Digestive enzymes

The amylase activity was significantly higher in groups 0.5 and 2.0 citral per kg of feed than in the control group. Lipase activity was higher in all groups fed with citral compared to control group. Chymotrypsin and trypsin showed no significant difference between groups. However, pepsin was significantly higher in fish fed 0.5 citral per kg of feed than control group (Figure 1).

DISCUSSION

The highest dietary insertion of citral did not affect significantly the common snooks zootechnical parameters analyzed compared to control. In contrast, the lowest dietary insertion of citral (0.5 mL citral per kg of feed) was harmful, with the worst values of WG, SGR and FC. A similar amount of dietary citral (0.3 g citral per kg of feed) had no effect on the growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after 30 days (JENSEN et al., 2015). Interestingly, dietary addition of the EO of ginger (*Zingiber officinale*) (5 or 10 g per kg of feed), which contains citral (α -citral 23.9% and β -citral 17.2%), did not affect final weight of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after 55 days, but 15 g per kg of feed of this EO decreased final weight compared to control fish (BRUM et al., 2017). Silver catfish fed 2 mL EO of *A. triphylla* per kg of feed (α -citral 29.4% and β -citral 20.8%) improved growth of silver catfish (ZEPPENFELD et al., 2016, 2017), but did not change growth of zebrafish (*Danio rerio*) (ZAGO et al., 2018). Dietary addition of 1 or 3 mL of microencapsulated EO of *C. flexuosus* (contains α -citral 45.7% and β -citral 32.1%), did not change growth parameters of silver catfish, but the duration of the experiment was only 30 days and the fish were adults. The group fed with 1 mL microencapsulated *C. flexuosus* EO per kg of feed increased carcass yield and protein deposition, but reduced the gonadosomatic index and fat deposition in comparison to the control group (RAMPELOTTO et al., 2018). Therefore, the effect of citral and EOs containing this compound as major constituent on fish growth varies according to the species and other compounds present in the EOs. A recent study demonstrated that the addition of citral to the diet of *C. undecimalis* juveniles at equivalent levels and for the same period is not beneficial, since oxidative damage was verified the liver and gills of the animals (MORI et al., 2019).

There are no studies dealing with dietary addition of citral and digestive enzymes. The dietary addition of the microencapsulated EO of *C. flexuosus* did not change the activity

of intestinal trypsin and chymotrypsin in silver catfish (RAMPELOTTO et al., 2018). The same authors suggested that the increased carcass yield and protein content verified in this species were not due to an improvement in protein digestibility. The only study that analyzed the effect of dietary EO supplementation and digestive enzymes activity in fish used the EO of cinnamon, which contains different main compounds (IMANI et al., 2017). The increase in the activity of the enzymes pepsin, amylase and lipase in common snooks that received diets supplemented with citral may be due to an effort to improve the nutrient utilization efficiency. However, no clear relationship between the effect of citral on digestive enzymes activity and growth was observed.

CONCLUSION

The results obtained indicated that in spite of increasing the activity of some digestive enzymes, dietary addition of citral does not improve common snook growth, even impairing it at 0.5 mL citral per kg of feed. Therefore, dietary supplementation with citral is not recommended for common snook.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq, Brazil) by research fellowships granted to B. Baldisserotto and B.M. Heinzmann and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) by PhD scholarships (Finance Code 001) granted to B.T. Michelotti and A.P.G. Almeida.

COMMITTEE ON ETHICS AND BIOSAFETY

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFSC under registration n° PP00861/2013.

REFERENCES

ALMEIDA, A. P. G. et al. Composition of gastrointestinal content, protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (Teleostei: Actinopterygii) with two different feeding habits. **Zoologia**, v. 35, p.1-8, 2018. Available from:

<<https://zoologia.pensoft.net/articles.php?id=13286>>. Accessed: May 10, 2018.

BERNFELD, P.; COLOWICK, S. P. **Methods in enzymology**. by SP Colowick and NO Kaplan. New York: Academic Press Inc, 1995.

BRUM, A. et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v.

468, n.1, p. 235–243, 2017. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848616306925>>. Accessed: May 10, 2018.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n.

3–4, p. 303–314, 2000. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848699003221>>. Accessed: May 10, 2018.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, n. 3–4, p.

267–283, 1999. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484869800413X>>. Accessed: May 10, 2018.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 12, p.

1393–1399, 1959. Available from:
 <<https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/o59-157>>. Accessed: May 10, 2018.

IMANI, A. et al. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. **Aquaculture**, v. 476, n. 7, p. 160–167, 2017. Available from:
 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484861730265X>>. Accessed: May 10, 2018, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.04.023.

JENSEN, L. B. et al. Reducing sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) through functional feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 983–993, 2015. Available from:
 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/anu.12222>>. Accessed: May 10, 2018.

LOWERRE-BARBIERI, S. K.; VOSE, F. E.; WHITTINGTON, J. A. Catch-and-release fishing on a spawning aggregation of common snook: does it affect reproductive output? **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 132, n. 5, p. 940–952, 2003. Available from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/T02-001>>. Accessed: May 10, 2018.

MICHELOTTI, B. T. et al. Growth and metabolic parameters of common snook juveniles raised in freshwater with different water hardness. **Aquaculture**, v. 482, p. 31–35, 2018. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848617309936>>. Accessed: Dec 12, 2018.

MOHAMADI SAEI, M. et al. Effects of dietary savory and myrtle essential oils on growth, survival, nutritional indices, serum biochemistry, and hematology of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fry. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, n. 6, p. 779–785, 2016. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jwas.12306>> Accessed: Dec 12, 2018.

MORI, N. C. et al. Citral as a dietary additive for *Centropomus undecimalis* juveniles: Redox, immune innate profiles, liver enzymes and histopathology. **Aquaculture**, v. 501, p. 14–21, 2019. Available from <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848618303466>> Accessed: Apr 7, 2019, doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.003.

PARK, J. T.; JOHNSON, M. J. A submicrodetermination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 181, p. 149–151, 1949. Available from <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19491404323>> Accessed: May 10, 2018.

PASSINI, G et al. Primeira experiência de maturação e desova do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, em cativeiro no Brasil. **XI Reunião Científica do Instituto de Pesca**, p. 143–145, 2013. Available from <https://www.pesca.sp.gov.br/11recip2013/resumos/11a_ReCIP_R44_143-145.pdf> Accessed: May 10, 2018.

RAMPELOTTO, C. et al. Supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil improves protein deposition and carcass yield in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 40, p. 1–8, 2018. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86722018000100102&script=sci_arttext> Accessed: May 10, 2018, doi: 10.4025/actascianimsci.v40i1.36517.

RHODY, N. R. et al. Parental contribution and spawning performance in captive common snook *Centropomus undecimalis* broodstock. **Aquaculture**, v. 432, p. 144–153, 2014. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614001987>>. Accessed: May 10, 2018.

SÖNMEZ, A. Y. et al. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. **Fish**

Physiology and Biochemistry, v. 41, n. 1, p. 165–175, 2015. Available from <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-014-0014-9>> Accessed: May 10, 2018.

TUCKER JR, J. W. Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n. 1, p. 49–57, 1987. Available from <[https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640\(1987\)49%3C49%3ASATSCA%3E2.0.CO%3B2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8640(1987)49%3C49%3ASATSCA%3E2.0.CO%3B2)> Accessed: May 10, 2018.

ZAGO, D. C. et al. *Aloysia triphylla* in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth performance. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 465–474, 2018. Available fom <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-017-0446-0>> Accessed: Dec 12, 2018.

ZEPPEFELD, C. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1362–1367, 2017. Available fom <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/anu.12511>> Accessed: May 30 10, 2018.

ZEPPEFELD, C. C. et al. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 933–940, 2016. Available <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/anu.12311>> Accessed: May 10, 2018.

Table 1 - Water quality (mean \pm standard error) of the four independent recirculation systems from a 45-day experiment with *Centropomus undecimalis* fed dietary citral supplementation.

	CITRAL (mL per kg of feed)			
	Control	0.5	1.0	2.0
Temperature (°C)	31.42 \pm 0.06	31.49 \pm 0.06	31.81 \pm 0.04	31.62 \pm 0.04
Dissolved oxygen (mg L⁻¹)	4.73 \pm 0.03	4.51 \pm 0.07	4.76 \pm 0.04	4.54 \pm 0.02
Dissolved oxygen (%)	75.75 \pm 0.05	73.22 \pm 0.51	75.58 \pm 0.64	72.04 \pm 0.50
Ph	8.17 \pm 0.01	8.14 \pm 0.01	8.19 \pm 0.01	8.22 \pm 0.01
Salinity (ppt)	31.03 \pm 0.01	31.21 \pm 0.05	31.15 \pm 0.03	31.03 \pm 0.01
Alkalinity (mg CaCO₃ L⁻¹)	102.16 \pm 12.41	102.66 \pm 12.37	102.33 \pm 5.87	102.24 \pm 8.23
Nitrite (mg L⁻¹)	0.27 \pm 0.08	0.20 \pm 0.05	0.29 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05
Total ammonia (mg L⁻¹)	0.29 \pm 0.04	0.26 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02	0.32 \pm 0.07

Table 2 -Formulation (%) of the experimental diet and analyzed proximate average composition.

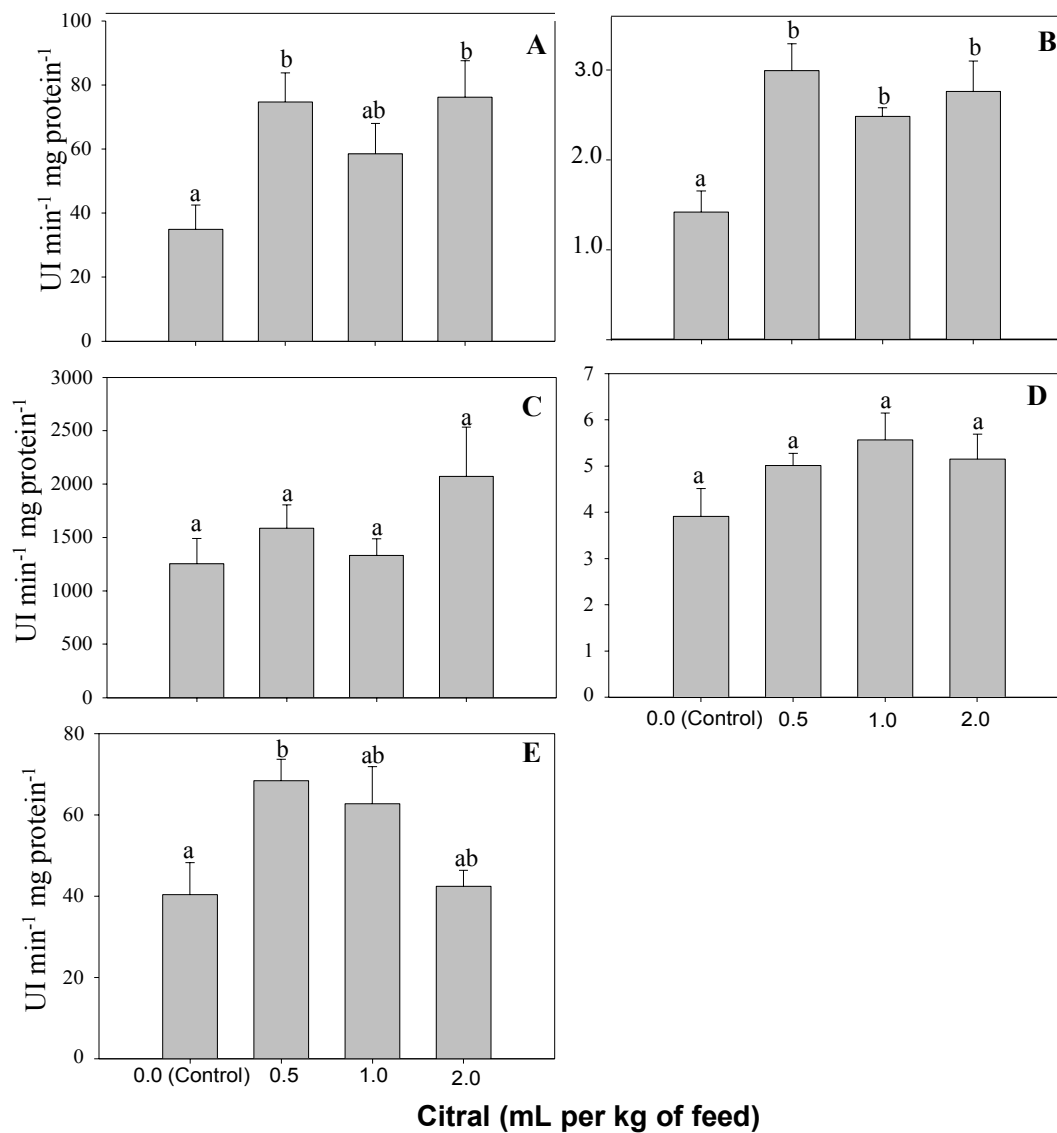
Ingredients	g kg⁻¹
Starch	140
Soy lecithin	10
Vitamins and minerals (premix)*	5
Fresh squid	120
Fish meal	700
Fish oil	24
Vitamin C	1
Composition	(%)
Dry matter content	94.32
Protein	53.73
Ether extract	9.19
Mineral matter	20.73
Acid detergent fiber	2.04
Neutral detergent fiber	14.31

*Vitamin and mineral mixture (security levels per kilogram of product) — folic acid: 250 mg, pantothenic acid: 5,000 mg, antioxidant: 0.60 g, biotin: 125 mg, cobalt: 25 mg, copper: 2000 mg, iron: 820 mg, iodine: 100 mg, manganese: 3750 mg, niacin: 5000 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1,000,000 UI, vitamin B1: 1250 mg, vitamin B12: 3750 mcg, vitamin B2: 2500 mg, vitamin B6: 2485 mg, vitamin C: 28,000 mg, vitamin D3: 500,000 UI, vitamin E: 20,000 UI, vitamin K: 500 mg, zinc: 17,500 mg.

Table 3 -Zootechnical parameters (mean \pm standard error) of common snook, *Centropomus undecimalis* fed dietary citral supplementation.

		CITRAL (mL per kg of feed)			
		Control	0.5	1.0	2.0
	22	3.86 \pm 0.24 ^{ab}	2.72 \pm 0.23 ^b	4.64 \pm 0.24 ^a	4.08 \pm 0.26 ^{ab}
WG (g)	45	6.23 \pm 0.52 ^a	2.14 \pm 0.23 ^b	4.93 \pm 0.06 ^a	5.91 \pm 0.43 ^a
SGR (%)	22	3.97 \pm 0.16 ^a	3.11 \pm 0.19 ^b	4.48 \pm 0.14 ^a	4.12 \pm 0.17 ^a
day⁻¹	45	2.87 \pm 0.13 ^a	1.42 \pm 0.07 ^b	2.22 \pm 0.05 ^a	2.71 \pm 0.22 ^a
	22	1.83 \pm 0.08 ^{ab}	2.21 \pm 0.09 ^b	1.46 \pm 0.07 ^a	1.76 \pm 0.05 ^{ab}
FC (g g⁻¹)	45	1.41 \pm 0.08 ^a	2.36 \pm 0.13 ^b	1.77 \pm 0.06 ^a	1.50 \pm 0.12 ^a
	22	0.86 \pm 0.005 ^b	0.78 \pm 0.006 ^a	0.84 \pm 0.004 ^b	0.85 \pm 0.02 ^b
FK (g cm⁻³)	45	0.83 \pm 0.003 ^a	0.78 \pm 0.006 ^a	0.80 \pm 0.018 ^a	0.80 \pm 0.008 ^a

WG = weight gain (g), SGR = specific growth rate, FC = feed conversion ratio, FK = condition factor. Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments using one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)

Figure 1

Digestive enzyme activity in common snook, *Centropomus undecimalis* fed 45 days with feed supplemented with different levels of citral. A - amylase, B - lipase, C - chymotrypsin, D - trypsin, and E - pepsin.

1 **5. MANUSCRITO 1:** será submetido para Journal of the World Aquaculture Society

2 **Dietary citral supplementation for *Sardinella brasiliensis* exposed to a**
3 **stressful condition: zootechnical, histological and digestive enzymes**
4 **parameters**

5 Running title: citral as food additive for Brazilian sardine

6 Bruna Tomazetti Michelotti^a, Caio Magnotti^b, Ana Carolina Klinger^a, Leticia
7 Bogoni Bianchin^a, Sharine Nunes Descovi^a, Vinicius Ronzani Cerqueira^b, Bernardo
8 Baldisserotto^{a, c*}

9 ^a*Graduate Program in Animal Husbandry, Federal University of Santa Maria/ UFSM,*
10 *97105-900 Santa Maria, RS, Brazil* ^b*Marine Fisheries Laboratory, Department of*
11 *Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, 88061-600, Florianópolis, SC, Brazil,*
12 ^c*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 97105-*

13 *900, Santa Maria, RS, Brazil*

14
15 *Corresponding author

16 Name: Bernardo Baldisserotto

17 E-mail: bbaldisserotto@hotmail.com

18 Address: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of
19 Santa Maria - 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

20

21

22

23

24

25

26 **ACKNOWLEDGMENTS**

27 The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq,
28 Brazil) by research fellowships granted to B. Baldisserotto and V.R. Cerqueira, and
29 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) by
30 PhD and MSc scholarships granted to B.T. Michelotti and Ana Carolina Klinger and
31 S.N. Descovi, respectively.

32

33 **ABSTRACT:**

34 Essential oils from plants whose main compound is citral showed beneficial effects
35 when added to fish feed. Consequently, the aim of the present study was to evaluate
36 the effect of supplementation with citral on zootechnical parameters, intestinal
37 morphology and digestive enzymatic activity of the Brazilian sardine, *Sardinella*
38 *brasiliensis*. Juveniles were exposed to chronic stress by abrupt light change and fed
39 for 20 days on diets containing different amounts of citral (0.0 - control, 0.5, 1.0 and
40 2.0 mL per kg of diet). At the end of the experimental period, there was no statistical
41 difference for zootechnical parameters except for survival, in which all treatments
42 containing citral had higher results than the control. The highest activity of intestinal
43 lipase occurred in the treatment with 2.0 mL citral per kg of diet insertion. Fish fed
44 citral supplementation at 0.5 mL per kg presented higher villus diameter, while those
45 fed 2 mL kg had higher depth of the crypts than fish fed the control diet. We
46 concluded then that the crystal when added to the required species was beneficial
47 and protective in terms of survival.

48

49 **Keywords:** amylase, pepsin, lipase, growth

50

51

52 **1. Introduction**

53 In aquaculture systems, photoperiod is regulated by timers that switch
54 illumination in established hours, and usually there is no graduation in the light
55 intensity changes. These sudden light-intensity variations can provoke changes in
56 fish locomotor response (Xie et al., 2019) and plasma levels of cortisol and glucose
57 (Ryu et al., 2020). In this context, the use of feed supplements arises as a potential
58 solution to improve animal welfare by the attenuation of stress responses (Bai et al.,
59 2015; Sneddon et al., 2016). Several essential oils (EOs) and their isolated
60 compounds have been used as dietary additives, improving growth and resistance to
61 stress and diseases (Sönmez et al., 2015; Brum et al., 2017; Zeppenfeld et al., 2016,
62 2017; Souza et al., 2019).

63 Citral is the major component of EOs extracted from different plants, as *Aloysia*
64 *triphylla* and *Cymbopogon flexuosus*, whose inclusion as dietary supplements
65 increased growth and improved oxidative status (Zeppenfeld et al., 2016, 2017),
66 carcass yield and protein deposition in silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Rampelotto
67 et al., 2018). Biologically, citral has been listed as a promoter of anesthetic activity
68 (Sousa et al., 2015), sedative (Do Vale et al., 2002), antifungal (Ferreira et al., 2009)
69 and anti-inflammatory (Ortiz et al., 2010). Its use as a dietary supplement for fish is
70 still little known. Diets containing citral increased lysozyme activity, reduced
71 hemolytic activity and intestinal myeloperoxidase activity and reduced stomach pH in
72 silver catfish (Sutili et al. 2019). The activity of some digestive enzymes increased in
73 common snook (*Centropomus undecimalis*) fed diets supplemented with citral, but
74 without significant changes in zootechnical performance (Michelotti et al 2020) and
75 did not improve oxidative parameters and innate immunity (Mori et al., 2019).

76 Species of the genus *Sardinella* are widely distributed around the world,
77 inhabiting the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. Although species of great
78 importance to commercial fishing are included in this genus, abrupt variations in
79 capture occur annually (Jablonski, 2007), so captive production is an alternative to
80 supply existing demand. The Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) is
81 geographically isolated from other groups in the Atlantic Ocean (Cergole e Dias-
82 Neto, 2011) and it is one of the main marine resources from Brazil (FAO, 2016;
83 Gigliotti et al., 2010). This species has very favorable characteristics for aquaculture.
84 It has a well-established consumer market, a short life cycle, rapid growth and high
85 fecundity (Perin and Vaz-dos-Santos, 2014). Its feeding habits are based on phyto
86 and zooplankton (Schneider and Schwingel, 2000) and can take advantage of natural
87 feed in certain conditions of captivity and easily accepts artificial feed (Cerqueira et
88 al. 2020). The current study aimed to evaluate the effects of dietary citral
89 supplementation on growth, gastrointestinal morphometry and digestive enzymes
90 activity in Brazilian sardines exposed to stress caused by sudden light change for
91 photoperiod regulation.

92

93 **2. Material and methods**

94

95 *2.1. Animals and rearing conditions*

96 The experiments were performed in the Marine Fish Culture Laboratory
97 (LAPMAR) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa
98 Catarina state, Brazil. Juvenile second generation (F2) of *Sardinella brasiliensis*
99 (initial weight 8.6 ± 0.04 g and total length 9.7 ± 0.04 cm) were obtained by
100 spontaneous spawning occurred in the broodstock tank as described by Magnotti et

101 al. (2020). Larva and juvenile maintenance were carried out in accordance with
102 Cerqueira et al. (2020). The study was approved by the Ethics Committee on Animal
103 Experimentation of UFSC under registration n° PP00861/2013. The fish were
104 acclimated for four days to the experimental feed. Remains of food and feces were
105 removed daily through siphoning, and an average of 25% of the water was renewed.
106 The water parameters were checked daily (temperature, pH and dissolved oxygen)
107 or weekly (ammonia and nitrite) throughout the experimental period, as described by
108 Michelotti et al. (2018).

109 Juveniles (n=20 per tank) were randomly distributed in four water recirculation
110 systems with salinity 33.15 ± 0.25 ppt and temperature 27.11 ± 0.11 °C. The pH was
111 maintained at 8.24 ± 0.01 , dissolved oxygen at 6.13 ± 0.05 mg L⁻¹, nitrite 0.27 ± 0.03
112 mg L⁻¹ and total ammonia 0.2 ± 0.01 mg L⁻¹. Each recirculation system consisted of
113 three circular tanks (150 L). The water contained in these experimental units was
114 removed through a central pipeline with a bag filter (50 µm), a biological filter, a foam
115 fractionator and an ultraviolet sterilizer (60 W). After treatment, water returned to the
116 experimental tanks. Fish were maintained on a photoperiod of 12 h light and 12 h
117 dark and the change in the light and dark cycle occurred abruptly (on-off switch).
118 Sardines of all treatments responded to these sudden light-intensity variations with
119 jumps and burst of rapid swimming movements.

120

121 2.2. Citral

122 Citral (α -citral=60.15%, β -citral=39.85%) was obtained from Sigma-Aldrich® (St.
123 Louis, Missouri, USA). The quantification of the isomers was described in Mori et al.
124 (2018).

125

126 2.3. *Diets and experimental design*

127 Four diets based on the same initial formulation (Sterzelecki et al., 2017) were
128 produced, cold-dried at 16 °C and subsequently pelleted at 2 mm (Table 1). Different
129 amounts of citral (0-control, 0.5, 1.0, 2.0 mL per kg of diet) were added to the mixture
130 together with fish oil prior to the drying and pelletizing processes. The experimental
131 design resulted in four groups (in triplicate). Fish received the experimental diets to
132 apparent satiety four times a day (9 a.m. and 1, 3 and 6 p.m.) for 20 days. The feed
133 was suspended 24 h prior to final sampling.

134 After 20 days, three fish from each tank (n = 9 animals per treatment) were
135 anesthetized with 50 mg L⁻¹ of benzocaine and euthanized by sectioning of the spinal
136 cord. Stomach and intestine were removed and immediately frozen in liquid nitrogen.
137 The tissues were then stored at -20 °C for further analysis.

138

139 2.4. *Zootechnical Parameters*

140 At days 1 and 20 all fish were anesthetized with 50 mg L⁻¹ benzocaine,
141 measured and weighed to calculate survival (S), weight gain (Wg), specific growth
142 rate (SGR) and feed conversion (FC) as described by Michelotti et al. (2018).
143 Survival was calculated by the equation: $S=(IN-FN/IN)*100$, where IN is the initial
144 number and FN is the final number of juveniles. Condition factor (K) was calculated
145 by the equation: $K=(FW/FL^3)*100$, where FW is the final weight and FL is the final
146 length. Individual feed intake (g) was measured daily for each tank.

147

148 2.5. *Digestive enzymes*

149 Samples from stomach and intestine were homogenized in an ice bath at ratio
150 1:10 (tissue: homogenization buffer) with an Ultraturrax. The homogenization buffer

151 solution was composed by 20 mM Tris/ 10 mM phosphate, pH 7.0 in 50% (v/v)
152 glycerol. The extract was centrifuged, and supernatant was utilized in assays as
153 enzyme source.

154 Amylase activity in the intestine was assayed in 0.2 M phosphate-citrate buffer, pH
155 7.0, 0.5% NaCl with a starch concentration of 2.5%. The reaction was stopped by
156 adding Ba(OH)₂ 0.3 N and ZnSO₄ 5%. The experimental protocol was modified
157 according to Bernfeld e Colowick (1955). The determination of starch hydrolysis was
158 done following Park and Johnson (1949). The absorbance was recorded at 660 nm.
159 One unit of enzyme was defined as 1 mmol of glycosyl-glucose released from starch
160 per min per mg of protein.

161 Lipase activity in the intestine was assayed as described by Gawlicka et al (2000)
162 and chymotrypsin and trypsin assays were performed according to Hummel (1959).
163 Pepsin activity in the stomach was assayed as described by Hidalgo, Urea & Sanz
164 (1999). Enzyme activities were calculated as described by Almeida et al (2018).

165

166 2.6. *Intestinal histology*

167 For histological analysis, samples of previous intestine portions were collected
168 immediately after slaughter, fixed in 10% formaldehyde, cleaved, dehydrated in
169 increasing alcohol, starting from 70% to absolute alcohol, diaphanized in xylol
170 (Xylene) and included in molten paraffin. After solidification, the blocks were
171 sectioned in a microtome, with a thickness of six micrometers, and the sections
172 adhered to histological slides. For staining, the H-E technique (hematoxylin-eosin)
173 was used. For morphometric analysis, the number of villi was counted and the
174 intestine diameter and villus height were measured. Nine replicates of each treatment
175 were used to observe the histological structure of the intestine. In each one, for the

176 diameter the intestine area was measured in the 4x magnification and after the ruler
177 was measured (Scalebar - correction factor with the same increase) and the height
178 was estimated in ten villi. Morphometry measurements were performed using ImageJ
179 software.

180

181 *2.7. Statistical analysis*

182 The results are expressed as mean \pm standard error. The Levene's test was
183 performed to evaluate the homogeneity of variance of the data. Comparisons
184 between treatments were made by one-way ANOVA followed by Tukey's test. All
185 analyses were performed using Statistica Software 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA)
186 and the regression analysis was performed using Sigma Plot 11.0 software.
187 Differences were considered significant at $p < 0.05$.

188

189 **3 Results**

190

191 *3.1. Zootechnical parameters*

192 Survival of the sardines was low, and dietary addition of citral increased their
193 survival (Figure 1A). However, there was a significant "U" shape relationship between
194 dietary citral supplementation and weight gain, specific growth rate, feed conversion
195 rate and condition factor, with the worst value around 1.0 mL per kg of diet (Figures
196 1B, C, D, E).

197

198 *3.2. Digestive enzymes*

199 Amylase activity increased exponentially with the highest dietary citral level
200 (Figure 2A), and there was a significant positive relationship between lipase and
201 pepsin activities with dietary citral levels (Figures 2B, C).

202 3.3 Intestinal histology

203 There were no significant changes or relationship between the height and
204 diameter of villi in the intestine of the fish fed different dietary citral levels ($p > 0.05$).
205 However, there was a significant positive relationship number of villi and crypta with
206 dietary citral levels (Figures 3B, D).

207

208 4. Discussion

209 The sudden light-intensity variations due to changes in night/day periods
210 provoked changes in the sardines swimming behavior, demonstrating that the fish
211 were stressed by these alterations. This is in agreement with the observed changes
212 locomotor response in zebrafish, *Danio rerio* exposed to sudden light-intensity
213 variations (Xie et al., 2019) and higher plasma glucose and cortisol levels in goldfish,
214 *Carassius auratus* raised in a similar light dimming system (Ryu et al., 2020).

215 The dietary addition of citral did not improve zootechnical parameters of *S.*
216 *brasiliensis* during the experimental period, and even impaired these parameters in
217 the intermediate doses tested. However, dietary citral supplementation increased the
218 survival of sardines in the stressful situation tested. Dietary citral addition (0.3 g citral
219 kg feed⁻¹) had no effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth after 30 days
220 (Jensen et al., 2015). The dietary addition of ginger EO (*Zingiber officinale*) (5 or 10 g
221 kg feed⁻¹), which contains citral (α -citral 23.9% and β -citral 17.2%), did not affect the
222 final weight of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after 55 days, and 15 g kg feed⁻¹ of
223 this EO decreased the final weight compared to control fish (Brum et al., 2017). Silver
224 catfish fed with 2 mL of *A. triphylla* EO kg of feed⁻¹ (α -citral 29.4% and β -citral 20.8%)
225 improved silver catfish growth (Zeppenfeld et al., 2017), but not alter that of zebrafish
226 (Zago et al., 2018). The same dietary citral levels used in the present study impaired

227 zootechnical parameters and induced oxidative damage in the liver and gills of
228 common snook (*Centropomus undecimalis*) (Mori et al., 2019; Michelotti et al., 2020).
229 These results indicate that the effect of citral and EOs containing this compound as
230 feed additive for fish growth varies according to the species and the synergy of the
231 other compounds present in the EOs.

232 The use of EOs as feed additives had positive effects on digestion, stimulating
233 the secretion of digestive enzymes (Mitsch et al., 2004) and the intestinal microbial
234 community (Bento et al., 2013; Brenes & Roura, 2010; Franz et al., 2010; Giannenas
235 et al., 2013). In the present study the activity of the digestive enzymes as well as the
236 number of villi and crypta of sardines increased proportionally to the dose of dietary
237 citral. of sardines. Dietary addition of *A. triphylla* EO significantly increased intestinal
238 folds in silver catfish (Zeppenfeld et al., 2016), corroborating the results of the
239 present study.

240 In conclusion, dietary supplementation with citral was effective to increase
241 survival of Brazilian sardines submitted to a stressful situation. In spite of improving
242 the activity of some digestive enzymes, no beneficial effect was observed on growth
243 performance.

244

245 **References**

- 246 Almeida, A. P. G., Zardo, E. L., Toni, C., Behr, E. R., Picolli da Silva, L., Vieira, J. P.,
247 Loro, V. L., & Baldisserotto, B. (2018). Composition of gastrointestinal content,
248 protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms
249 (Teleostei: Actinopterygii) with two different feeding habits. *Zoologia*, 35, 1–8.
- 250 Bai, S. C., Katya, K., & Yun, H. (2015). 7 - Additives in aquafeed: An overview. In D.
251 A. B. T.-F. and F. P. in A. Davis (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science,*
252 *Technology and Nutrition* (pp. 171–202). Woodhead Publishing.
- 253 Bento, M. H. L., Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Lahtinen, S., Nurminen, P.,
254 Saarinen, M. T., Schulze, H., Mygind, T., & Fischer, J. (2013). Essential oils and their

- 255 use in animal feeds for monogastric animals--Effects on feed quality, gut microbiota,
256 growth performance and food safety: a review. *Veterinarni Medicina*, 58(9).
- 257 Bernfeld, P., & Colowick, S. P. (1955). Methods in enzymology. By SP Colowick and
258 NO Kaplan, Academic Press Inc., New York, 149.
- 259 Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and
260 modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1–2), 1–14.
- 261 Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J.
262 L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger
263 on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus*
264 *agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235–243.
- 265 Cerqueira, V., Sterzelecki, F. C., Baloi, M., Magnotti, C., Cipriano, F. S., Manzoni, G
266 (2020). Cultivo da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). In: Bernardo
267 Baldisserotto. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ed.Santa Maria:
268 Editora UFSM, 2020, v. 1, p. 1-1.
- 269 Cergole, M. C., & Dias-Neto, J. (2011). Plano de Gestão para o Uso Sustentável da
270 Sardinha-verdadeira do Brasil. In *Ibama*.
- 271 Do Vale, T. G., Furtado, E. C., Santos Jr, J. G., & Viana, G. S. B. (2002). Central
272 effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from
273 *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Phytomedicine*, 9(8), 709.
- 274 FAO. (2016). *the State of World Fisheries and Aquaculture*.
- 275 Ferreira, T. M., Silva, F. de S., Teodoro, G. R., Costa, A. C. B. P. da, Maria, A.,
276 Beltrame Júnior, M., & Khouri, S. (2009). Citral antifungal activity against *Candida*
277 genus yeasts isolated from hospitalized patients. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*
278 (*Impresso*), 68(1), 118–125.
- 279 Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants
280 in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*,
281 25(5), 327–340.
- 282 Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M. H., Ross, N., Opstad, I., & Torrissen, O. J. (2000).
283 Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus*
284 *hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184(3–4), 303–
285 314.
- 286 Giannenas, I., Bonos, E., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2013). Essential oils and
287 their applications in animal nutrition. *Med. Aromat. Plants*, 2(140), 412–2167.
- 288 Gigliotti, E. da S., Gherardi, D. F. M., Paes, E. T., Souza, R. B., & Katsuragawa, M.

- 289 (2010). Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning
290 habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. *Journal of Fish Biology*,
291 77(10), 2248–2267.
- 292 Hidalgo, M. C., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes
293 in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*,
294 170(3–4), 267–283.
- 295 Hummel, B. C. W. (1959). A modified spectrophotometric determination of
296 chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and*
297 *Physiology*, 37(12), 1393–1399.
- 298 Jablonski, S (2007). A sardinha brasileira. Existe algum espaço para modelagem.
299 Revista Pan-Americana de Ciências Aquáticas , 2 (2), 86-93.
- 300 Jensen, L. B., Provan, F., Larssen, E., Bron, J. E., & Obach, A. (2015). Reducing sea
301 lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)
302 through functional feeds. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 983–993.
- 303 Magnotti, C. C. F., Sterzelecki, F. C., Cipriano, F. S., Pedrotti, F. S., Rocha, V. M., &
304 Cerqueira, V. R. (2020). Spontaneous spawning of brazilian sardine in captivity.
305 Boletim do Instituto de Pesca, 46(1).
- 306 Michelotti, B. T., Mori, N. C., Magnotti, C. C. F., Heinzmann, B. M., Almeida, A. P. G.,
307 Cerqueira, V. R., & Baldisserotto, B. (2020). Citral como aditivo na ração para robalo
308 flecha-parâmetros zootécnicos e enzimas digestivas. *Ciência Rural*, 50(4).
- 309 Michelotti, B. T., Passini, G., Carvalho, C., Salbego, J., Cossettin, N., Vieira, R.,
310 Baldisserotto, B., & Cerqueira, V. R. (2018). Growth and metabolic parameters of
311 common snook juveniles raised in freshwater with different water hardness.
312 *Aquaculture*, 482(August 2017), 31–35.
- 313 Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Köhler, B., Gabler, C., Losa, R., & Zimpernik, I. (2004).
314 The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of
315 *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*, 83(4),
316 669–675.
- 317 Mori, N. C., Michelotti, B. T., da Silva Pês, T., Bressan, C. A., Sutili, F., Kreutz, L. C.,
318 Garlet, Q., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Cerqueira, V. R. (2019). Citral as a
319 dietary additive for *Centropomus undecimalis* juveniles: Redox, immune innate
320 profiles, liver enzymes and histopathology. *Aquaculture*, 501, 14–21.
- 321 Ortiz, M. I., Ramírez-Montiel, M. L., González-García, M. P., Ponce-Monter, H. A.,
322 Castañeda-Hernández, G., & Cariño-Cortés, R. (2010). The combination of naproxen

323 and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Archives of Pharmacol*
324 *Research*, 33(10), 1691–1697. Park, J. T., & Johnson, M. J. (1949). A
325 submicrodetermination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 181, 149–151.

326 Perin, S., & Vaz-dos-Santos, A. M. (2014). Morphometry and relative growth of the
327 Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) in the southeastern
328 Brazilian bight. *Arquivos de Zoologia*, 45, 63–72.

329 Rampelotto, C., de Lima, J., Pinheiro, C. G., Salbego, J., da Silva, L. P., & Emanuelli,
330 T. (2018). Supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil
331 improves protein deposition and carcass yield in silver catfish (*Rhamdia quelen*).
332 *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 40, 1–8.

333 Ryu, H.S., Song, J.A., Park, H. et al. Physiological and oxidative stress response of
334 goldfish *Carassius auratus* induced by a light dimming system. *Fish Physiol Biochem*
335 46, 585–595 (2020).

336 Schneider, F., & Schwingel, P. R. (2000). A preliminary study on the trofic ecology of
337 *Sardinella brasiliensis* off southern brazil estudo preliminar da ecologia trófica da
338 *Sardinella brasiliensis* Na costa sudeste do Brasil. *Brazilian Journal of Aquatic*
339 *Science and Technology*.

340 Sneddon, L. U., Wolfenden, D. C. C., & Thomson, J. S. (2016). 12 - Stress
341 Management and Welfare. In C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell, & C. J. B. T.-F. P.
342 Brauner (Eds.), *Biology of Stress in Fish* (Vol. 35, pp. 463–539). Academic Press.

343 Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015). Growth
344 performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus*
345 *mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish*
346 *Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165–175.

347 Sousa, D. G., Sousa, S. D. G., Silva, R. E. R., Silva-Alves, K. S., Ferreira-Da-Silva,
348 F. W., Kerntopf, M. R., Menezes, I. R. A., Leal-Cardoso, J. H., & Barbosa, R. (2015).
349 Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat
350 sciatic nerves. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(8), 697–702.

351 Souza CdF, Baldissera MD, Baldisserotto B, Heinzmann BM, Martos-Sitcha JA and
352 Mancera JM (2019) Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture:
353 A Review. *Front. Physiol.* 10:785.

354 Sterzelecki, F. C., Sugai, J. K., Baloi, M., Passini, G., de Carvalho, C. V. A.,
355 Fracalossi, D. M., & Cerqueira, V. R. (2017). Effect of dietary carbohydrate to lipid
356 ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian

- 357 sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). *Aquaculture Research*, 48(9),
358 5111–5121.
- 359 Sutili, F. J., Kreutz, L. C., Flores, F. C., da Silva, C. D. B., Kirsten, K. S., Voloski, A.
360 P. D. S., & Baldisserotto, B. (2019). Effect of dietary supplementation with citral-
361 loaded nanostructured systems on innate immune responses and gut microbiota of
362 silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Functional Foods*, 60, 103454.
- 363 Xie R, Zhang M, Venkatraman P, Zhang X, Zhang G, Carmer R, et al. (2019)
364 Normalization of large-scale behavioural data collected from zebrafish. *PLoS ONE*
365 14(2): e0212234.
- 366 Zago, D. C., Santos, A. C., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V, Koakoski, G., de Abreu,
367 M. S., Zeppenfeld, C. C., Heinzmann, B. M., Marins, L. F., & Baldisserotto, B. (2018).
368 *Aloysia triphylla* in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth
369 performance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(2), 465–474.
- 370 Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Cunha, M.
371 A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed
372 additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*,
373 22(4), 933–940.
- 374 Zeppenfeld, C. C., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Salbego, J., Koakoski, G., dos
375 Santos, A. C., Heinzmann, B. M., da Cunha, M. A., Barcellos, L. J. G., Pavanato, M.
376 A., Caron, B. O., & Baldisserotto, B. (2017). *Aloysia triphylla* essential oil as food
377 additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. *Aquaculture*
378 *Nutrition*, 23(6), 1362–1367.
- 379 Zeppenfeld, C. C., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Salbego, J., Koakoski, G., Santos, A.
380 C., Heinzmann, B. M., Cunha, M. A., Barcellos, L. J. G., & Pavanato, M. A. (2017).
381 *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*–Stress and
382 antioxidant parameters. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1362–1367.
- 383
- 384
- 385
- 386
- 387
- 388

389 Table 1 - Formulation (%) of the experimental diet and analyzed proximate average
 390 composition

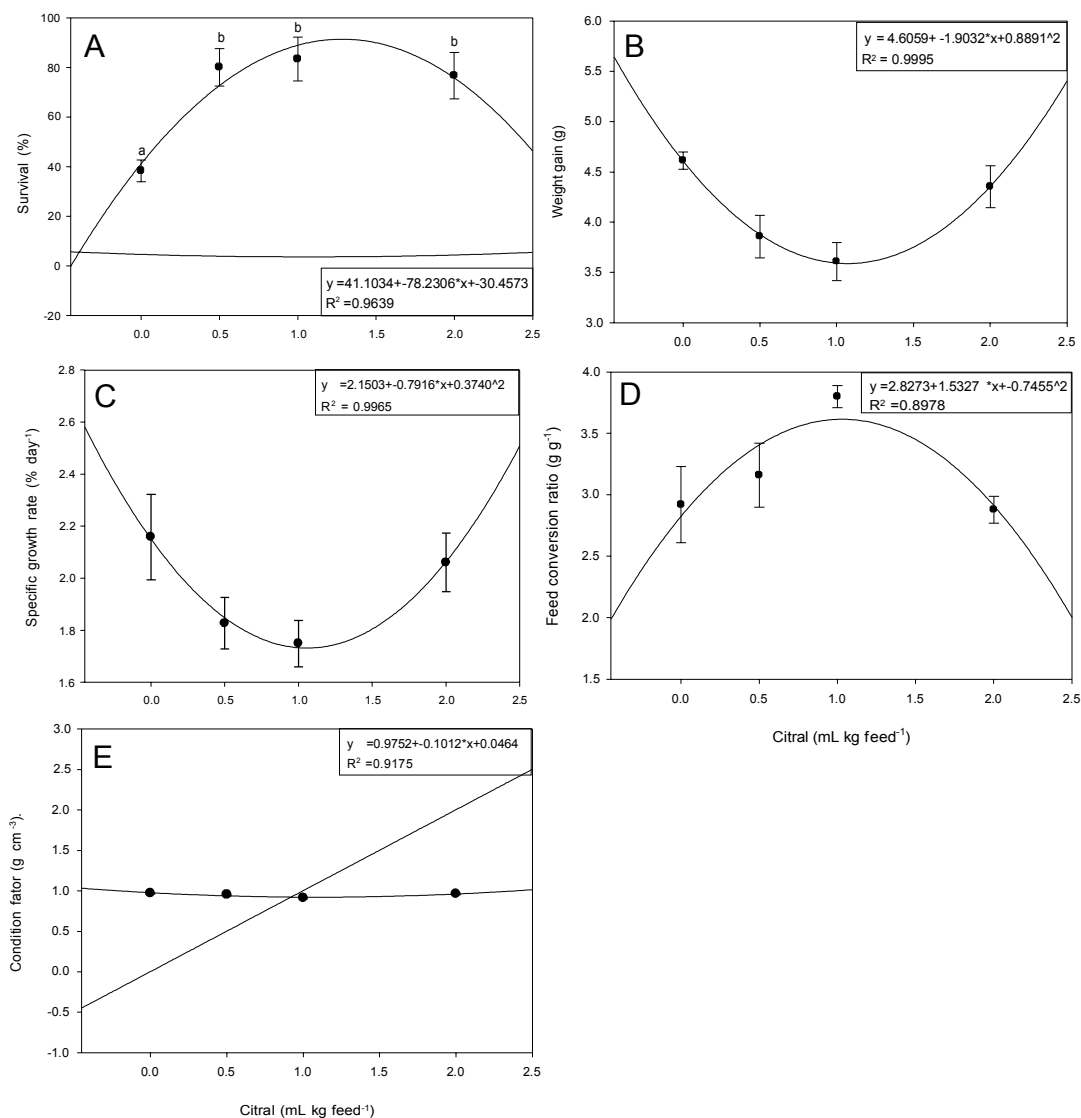
Ingredients	g kg⁻¹
Fish's flour	200
Fish oil	66.1
Vitamins and minerals (premix)	8.0
Dextrin	40.0
Gelatine	206.3
Casein	110.3
Cellulose	20.0
Dibasic calcium phosphate	
Composition	(%)
Dry matter content	88.14
Protein	34.69
Lipids	8.79
Mineral matter	5.51
Carbohydrate	30.00
CHO: L	0.34
Energy (J / kg)	1491.00

391

392 *Vitamin and mineral mixture (security levels per kilogram of product) — folic acid: 250
 393 mg, pantothenic acid: 5,000 mg, antioxidant: 0.60 g, biotin: 125 mg, cobalt: 25 mg,
 394 copper: 2000 mg, iron: 820 mg, iodine: 100 mg, manganese: 3750 mg, niacin: 5000
 395 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1,000,000 UI, vitamin B1: 1250 mg, vitamin B12:
 396 3750 mcg, vitamin B2: 2500 mg, vitamin B6: 2485 mg, vitamin C: 28,000 mg, vitamin
 397 D3: 500,000 UI, vitamin E: 20,000 UI, vitamin K: 500 mg, zinc: 17,500 mg.

398

399 Figure 1 – Zootechnical parameters of Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* fed
 400 dietary citral supplementation. A - Survival (%); B - weight gain (g); C - specific
 401 growth rate (% day⁻¹); D - feed conversion ratio (g g⁻¹), E - condition factor (g cm⁻³).



402

403 Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments
 404 using one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)

405

406

407

408

409

410 Figure 2 – Digestive enzymes activity in Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* 20
 411 days with feed supplemented with different levels of citral.

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

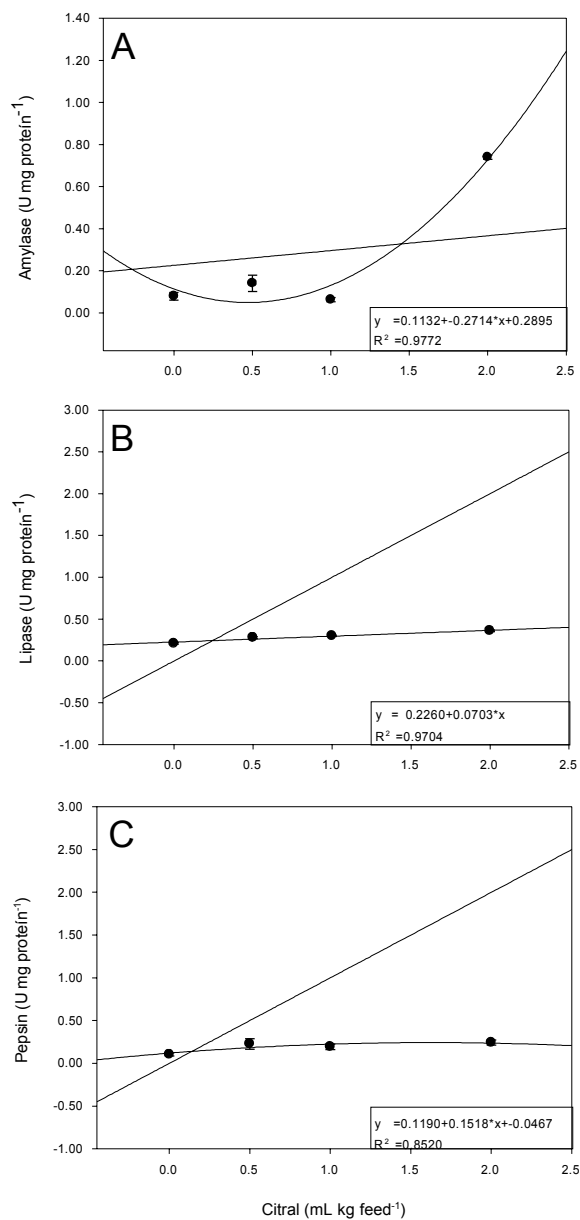
450

451

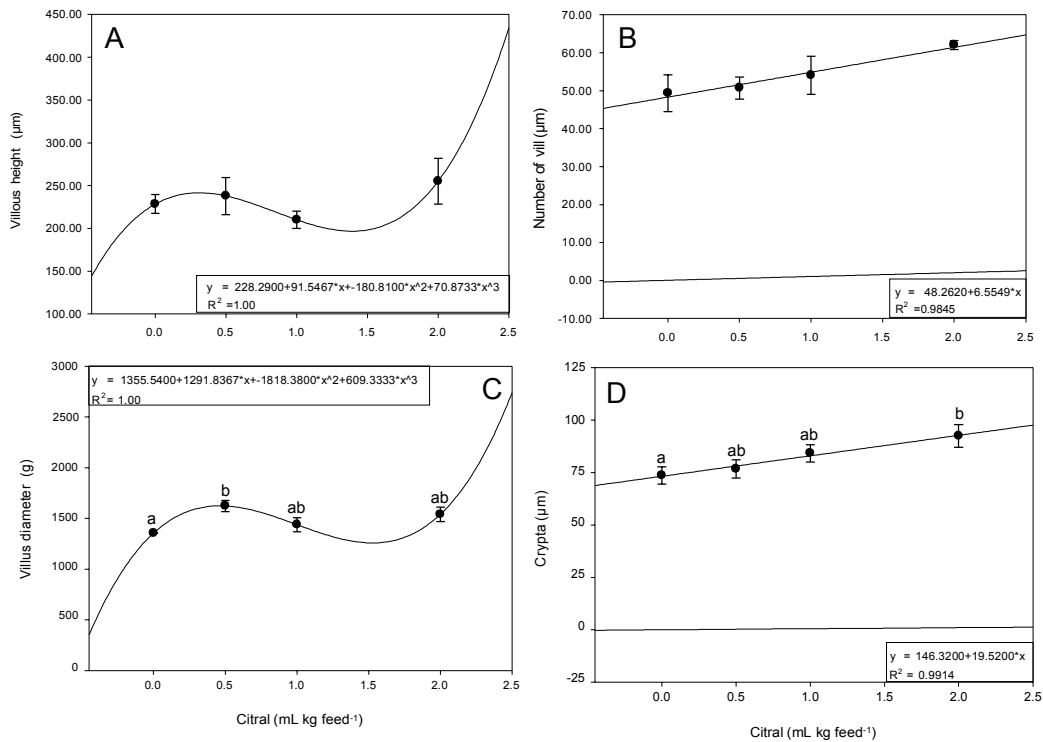
452

453

454 Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments
 455 using one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)



456 Figure 3 – Histological parameters of Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* fed
 457 with citral supplementation in the diet. A - villous height (μm); B - number of villi; C -
 458 villus diameter (μm); D - Crypta (μm).



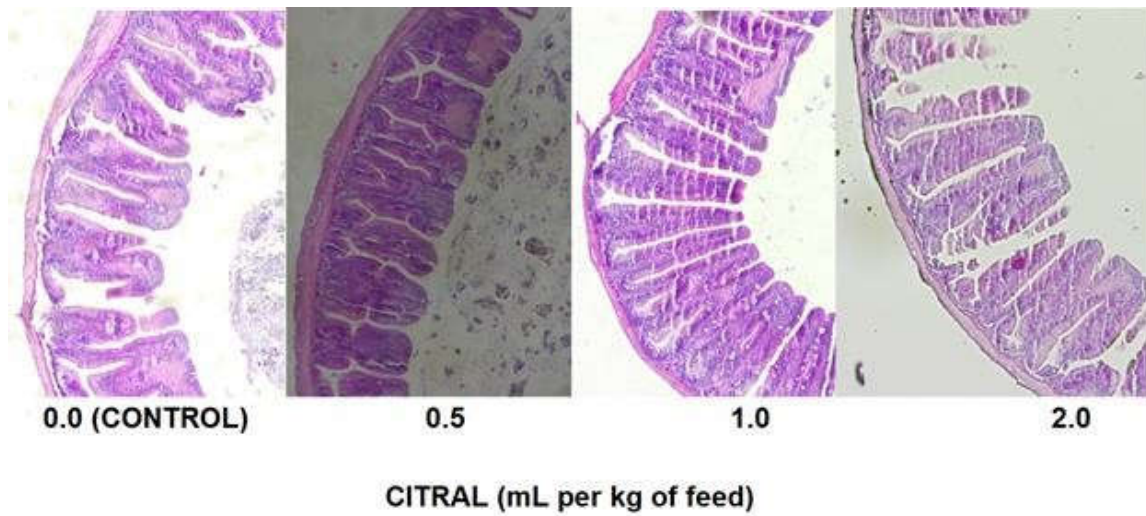
459

460 Different lowercase letters indicate significant difference between the treatments
 461 using one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)

462

463

464 Figure 4 –Anterior portion of the intestine of *Sardinella brasiliensis* fed with different
465 levels of dietary citral supplementation.
466



467
468
469
470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

1 **6. Manuscrito 2** – A ser submetido ao Journal Aquaculture Research

2 **GROWTH, METABOLIC PARAMETERS AND DIGESTIVE ENZYMES OF *MUGIL***
3 ***LIZA* FED DIETARY CITRAL SUPPLEMENTATION**

4 Running title: citral as food additive for mullets

5 Bruna Tomazetti Michelotti^a, Natacha Cossetin Mori^{b,c}, Caio Cesar Franca
6 Magnotti^d, Berta Maria Heinzmann^{b, e}, Vinicius Ronzani Cerqueira^d, Ana Paula Gottlieb
7 Almeida^a, Bernardo Baldisserotto^{a, b, f*}

8 ^a*Graduate Program in Animal Husbandry, Federal University of Santa Maria/*
9 *UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazi. ^bGraduate Program in Pharmacology,*

10 *Federal University of Santa Maria/ UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil*

11 ^c*Department of Health and Agricultural Sciences, University of Cruz Alta/UNICRUZ,*
12 *Rodovia Municipal Jacob Della Méa, s/n, 98020-290, Cruz Alta, RS, Brazil ^dMarine*

13 *Fisheries Laboratory, Department of Aquaculture, Federal University of Santa*
14 *Catarina, 88061-600, Florianópolis , SC, Brazil ^eDepartment of Industrial Pharmacy,*
15 *Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil ^fDepartment*

16 *of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 97105-900,*
17 *Santa Maria, RS, Brazil*

18
19
20 *Corresponding author

21 Name: Bernardo Baldisserotto

22 E-mail: bernardo.baldisserotto@ufsm.br

23 Address: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of
24 Santa Maria - 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

25

26 **ACKNOWLEDGMENTS**

27 The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq,
28 Brazil) by research fellowships granted to B. Baldisserotto, V.R. Cerqueira and B.M.
29 Heinzmann and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
30 (CAPES, Brazil) by PhD scholarships granted to B.T. Michelotti and A.P.G. Almeida.

31

32 **ABSTRACT:**

33 Essential oils from plants whose main compound is citral showed beneficial effects
34 when added to fish feed. Consequently, the aim of the present study was to evaluate
35 the effect of dietary supplementation with citral on the zootechnical and metabolic
36 parameters and digestive enzyme activity of mullets, *Mugil liza*. Juveniles were fed
37 for 45 days on diets containing different amounts of citral (0.0 - control, 0.5, 1.0 and
38 2.0 mL per kg of diet). At the end of the experimental period, the treatment with 2.0
39 mL of citral per kg of diet showed higher weight gain than the control treatment. Fish
40 fed 2.0 mL citral/kg of feed presented higher pepsin activity in the stomach and
41 amylase in the intestine than in the control fish. In conclusion, 2 mL citral/kg of feed is
42 beneficial for mullet growth and digestive activity, and can be recommended as a
43 food additive for this species.

44

45 **Keywords:** mullet, pepsin, intestinal enzymes, growth

46

47

48

49

50

51 Introduction

52

53 Mullet (*Mugil liza*) is an euryhaline species and can be found along the west
54 coast of South America to the southern Caribbean sea (Siccha-Ramirez, Menezes,
55 Nirchio, Foresti, & Oliveira, 2014). The species described as *M. liza* and *M. platanus*
56 are the same species that occur in South Atlantic, prevailing the name *M. liza*
57 because it was discovered first (Heras, Roldán, & Castro, 2009; Menezes, Oliveira, &
58 Nirchio, 2010). This species has omnivorous or detritivorous habits, feeding on
59 benthic organisms (algae, copepods, foraminifera, amphipods, bivalves, gastropods
60 and coral) or microalgae and diatoms according to the availability of food in the
61 environment (Garcia et al., 2018; Thompson, Fortunato, Chiesa, & Volpedo, 2015).

62 A few studies analyzed the effects of dietary supplementation with vegetable
63 extractives to improve mullet (*M. cephalus*) growth, as *Echinacea purpurea* leaf
64 extract (Akbari & Kakoolaki, 2019), *Ulva rigida* water-soluble polysaccharide extract
65 (Akbari & Aminikhoei, 2018), and *Camellia sinensis* leaf-extract (Kakoolaki et al.,
66 2016). Essential oils (OEs) have also been analyzed as dietary supplements to
67 improve fish growth, to reduce stress, and by their antimicrobial and antioxidant
68 effects (Souza et al., 2019). The dietary addition of the EO of *Aloysia triphylla*
69 improved the growth and / or oxidative state of silver catfish *Rhamdia quelen*
70 (Zeppenfeld et al., 2016, 2017). The main compound of this EO is citral, a
71 monoterpenic aldehyde composed of the geometric isomers neral and geranial,
72 which can also be found in a wide variety of plants (Saddiq & Khayyat, 2010). Dietary
73 supplementation with citral reduced stomach pH in silver catfish (Sutili et al., 2019)
74 and in spite of increasing the activity of some digestive enzymes in common snook

75 *Centropomus undecimalis*, did not improve weight gain (Michelotti et al., 2020) and
76 oxidative stress parameters (Mori et al, 2019).

77 Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of citral
78 dietary supplementation on zootechnical and metabolic parameters and digestive
79 enzyme activity of mullets.

80

81 **2. Material and methods**

82

83 *2.1. Animals and rearing conditions*

84 The experiments were performed in the Marine Fish Culture Laboratory
85 (LAPMAR) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa
86 Catarina state, Brazil. Juvenile *Mugil liza* (initial weight 6.69 ± 0.06 g and total length
87 8.56 ± 0.01 cm) were obtained by induced spawning of broodstocks as described by
88 Carvalho et al. (2019). Briefly, the first female hormonal injection was 20 mg kg^{-1} of
89 carp pituitary extract. After 24 h, the females received the second application, with
90 $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ of LHRHa and all males received an injection with $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ of LHRHa.

91 Juveniles (n=30 per tank) were randomly assigned to four independent water
92 recirculation systems (with no communication between them) with salinity $32.19 \pm$
93 0.18 and temperature of 27.11 ± 0.11 °C. The pH was maintained at 7.58 ± 0.13 ,
94 dissolved oxygen at $5.16 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$, alkalinity $103.65 \pm 0.34 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, nitrite
95 $0.2 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ and total ammonia $0.2 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1}$. Each recirculation system
96 consisted of three circular tanks (150 L). The water contained in these experimental
97 units was removed through a central pipeline with a bag filter (50 μm), a biological
98 filter, a foam fractionator and finally the ultraviolet sterilizer (60 W). After treatment,
99 water returned to the experimental tanks. The fish were acclimated for four days to

100 the experimental feed. Remains of food and feces were removed daily through
101 siphoning, and an average of 25% of the water was renewed. The water parameters
102 were checked daily (temperature, pH and dissolved oxygen) or weekly (alkalinity,
103 total hardness, ammonia and nitrite) throughout the experimental period.

104 The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of
105 UFSC under registration n° PP00861/2013.

106

107 *2.2. Citral*

108 Citral (α -citral=60.15%, β -citral=39.85%) was obtained from Sigma-Aldrich® (St.
109 Louis, Missouri, USA). The density of citral was 0.88 g·cm⁻³. The quantification of
110 the isomers was performed with an Agilent 6890A gas chromatograph coupled to an
111 Agilent Mass Selective Detector MSD 5973 with an HP-Chiral capillary GC column
112 (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m film thickness) and operated in electron ionization
113 mode at 70 eV. Helium was the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injector
114 temperature was set at 250 and detector at 280 °C. Oven temperature was
115 maintained at 40 °C for 4 min and then raised to 240 °C at a rate of 4 °C min⁻¹.
116 Sample solutions of 1 μ L (2:1000 in hexane, v/v) were injected in split mode. A
117 homologous series of n-alkanes (C8-C40) was injected under the same conditions of
118 the samples to calculate the Kovats retention indices. The constituents were
119 identified by means of mass spectrometry and Kovats retention index was compared
120 to data from the National Institute of Standards and Technology Mass Spectral
121 Library (NIST, 2008).

122

123 *2.3. Diets and experimental design*

124 Four diets based on the same initial formulation (Michelotti et al.,2018) were
125 produced, dried in an oven at 40 °C and subsequently pelleted at 6 mm (Table 1).
126 Different amounts of citral (0-control, 0.5, 1.0, 2.0 mL per kg of diet) were added to
127 the mixture together with fish oil prior to the drying and pelletizing processes. The
128 experimental design resulted in four groups (in triplicate). All feeds were kept in a
129 refrigerator up to 2 h before administration to the mullets. Fish received the
130 experimental diets to apparent satiety four times a day (9 and 12 a.m., 3 and 6 p.m.)
131 for 45 days. Feeding was suspended 24 h prior to final sampling.

132 After 45 days, three fish from each tank (n = 9 animals per treatment) were
133 anesthetized with 50 mg L⁻¹ of benzocaine and euthanized by sectioning of the spinal cord.
134 Liver, muscle, stomach and intestine were removed and immediately frozen in liquid nitrogen.
135 The tissues were then stored at -20 °C for further analysis.

136

137 *2.4. Zootechnical Parameters*

138 At days 1 and 45 all mullets were anesthetized with 50 mg L⁻¹ benzocaine,
139 measured and weighed to calculate weight gain (Wg), specific growth rate (SGR) and
140 feed conversion (FCR) as described by Michelotti et al. (2018). Condition factor (K)
141 was calculated by the following equation: $K=(FW/FL^3)*100$, where FW is the final
142 weight and FL is the final length. Individual feed intake (g) was measured daily for
143 each tank. The animals were kept at 12 hours light / 12 hours dark with lights on at 8
144 am.

145

146 *2.5. Digestive enzymes*

147 Samples from stomach, anterior and posterior intestine were homogenized in
148 an ice bath at ratio 1:10 (tissue: homogenization buffer) with an Ultraturrax. The
149 homogenization buffer solution was composed by 20 mM Tris/ 10 mM phosphate, pH

150 7.0 in 50% (v/v) glycerol. The extract was centrifuged, and supernatant was utilized
151 in assays as enzyme source.

152 Pepsin activity was assayed by the specific methods of Hidalgo et al. (1999).
153 The pepsin substrate was 1.5% casein in 0.2 M KCl (pH 1.8). Reactions were carried
154 out at 30 °C for 40 min, stopped with 15% TCA, and the optical density of the
155 supernatant recorded at 280 nm against tyrosine as standard. Specific activity was
156 expressed in U mg protein⁻¹ (U= μmol of hydrolyzed substrate min⁻¹ mg of protein⁻¹).
157 Trypsin and chymotrypsin activities were assayed according to Hummel (1959). The
158 trypsin substrate was 1.04 nM TAME-HCl (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester
159 hydrochloride) in 0.01 M CaCl₂/0.2 M Tris-HCl (pH 8.1), incubated at 25 °C and
160 optical density followed at 247 nm for 60 s. The chymotrypsin substrate was 1 mM
161 BTEE (n-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) in methanol 2:3 (v/v), assayed in 0.1 M
162 CaCl₂/0.1 M Tris-HCl (pH 7.8) at 30 °C, and the optical density of supernatant was
163 followed at 256 nm for 60 s. The trypsin and chymotrypsin activities were expressed
164 U mg protein⁻¹ (U= μmol of arginine min⁻¹ mg of protein⁻¹ and μmol of tyrosine min⁻¹
165 mg of protein⁻¹, respectively). Lipase activity was assayed by the specific method of
166 Gawlicka et al. (2000). Reaction was incubated with 0.4 mM p-nitrophenyl myristate
167 in 24 nM ammonium bicarbonate (pH 7.8) with 0.5% Triton X-100 at 30 °C for 30 min.
168 The reaction was stopped with 10 mM NaOH and the optical density followed at 405
169 nm. Specific activity was expressed in U mg protein⁻¹ (U= μmol of hydrolyzed
170 substrate min⁻¹ mg of protein⁻¹). Amylase activity was assayed in 0.2 M phosphate-
171 citrate buffer, pH 7.0, 0.5% NaCl with a starch concentration of 2.5%. The reaction
172 was stopped by adding Ba(OH)₂ 0.3 N and ZnSO₄ 5%. The experimental protocol
173 was modified in accordance to Bernfeld (1955). The determination of starch
174 hydrolysis was made following Park and Johnson (1949). The absorbance was

175 recorded at 660 nm. Specific activity was expressed in U mg protein⁻¹ (U= μ mol of
176 glicosil-glucose min⁻¹ mg of protein⁻¹). To establish the specific activities of the
177 enzymes, protein concentrations were determined in the enzyme extracts by the
178 method of Lowry et al. (1951), with bovine albumin as standard.

179

180 *2.6. Metabolic parameters*

181 Liver and muscle were weighed and homogenized with 1 mL of trichloroacetic
182 acid 10% to obtain an acid deproteinized extract using a homogenizer TURRAX type
183 (Marconi Equipment for Laboratory Industry Ltda, São Paulo, Brazil). The tissue
184 homogenates were centrifuged at 917 x g for 5 min at 4 °C. Glucose and lactate were
185 measured in liver and muscle according to Dubois et al. (1956) and Harrower and
186 Brown (1972) methods, respectively.

187

188 *2.7. Statistical analysis*

189 The results are expressed as mean \pm standard error. The Levene's test was
190 performed to evaluate the homogeneity of variance of the data. Comparisons among
191 treatments were made by one-way ANOVA followed by Tukey's test. All analyses
192 were performed using Statistica Software 7.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA), and
193 differences were considered significant at $P < 0.05$.

194

195 **3. Results**

196

197 *3.1. Zootechnical parameters*

198 Specific growth rate, condition factor and feed intake had no statistical
199 differences among treatments. Weight gain was higher in fish fed 2 mL citral per kg

200 diet than in those fed the control diet, while feed conversion was lower in fish fed
201 citral-supplemented diets (figure 1). Survival throughout the experiment was 100%.

202

203 3.2. *Digestive enzymes*

204 Fish fed 2.0 mL citral per kg of feed presented higher pepsin activity in the
205 stomach than fish fed control and 1.0 mL citral per kg of feed. The activity of amylase
206 in the intestine was also higher in fish fed 2.0 mL citral per kg of feed than in control
207 fish. The activities of trypsin, chymotrypsin and lipase were not affected by citral
208 supplementation (fig. 2).

209

210 3.3 Metabolic parameters

211 Fish fed 0.5 mL citral per kg of feed presented lower glucose levels in the liver
212 than fish fed the control and 2 mL citral per kg of feed diets. Muscle glucose levels
213 did not differ among the treatments. Liver lactate levels were higher in fish fed 2 mL
214 citral per kg of feed than those fed the control diet, while muscle lactate levels were
215 lower in fish fed 0.5 and 1.0 mL citral per kg of feed diets than in fish fed the control
216 diet (table 2).

217

218 4. Discussion

219

220 Feed additives have been used for terrestrial and aquatic animals to
221 ameliorate the digestive process and thus improve zootechnical indices (Nunes et al.,
222 2012). The use of these additives may have positive effects on digestion and
223 intestinal microbial community (Bento et al., 2013; Brenes & Roura, 2010; Franz,

224 Baser, & Windisch, 2010; Giannenas, Bonos, Christaki, & Florou-Paneri, 2013; Zeng,
225 Zhang, Wang, & Piao, 2015).

226 The improvement in the weight gain and feed conversion parameters in
227 mullets fed the diet containing the highest level of citral (2.0 mL/kg of feed) is in
228 accordance with the higher growth observed in silver catfish fed a diet containing the
229 same level of the citral-rich EO of *A. triphylla* (Zeppenfeld et al., 2016). However,
230 dietary citral supplementation at 0.5 mL/kg of feed reduced growth of common snook
231 and higher levels did not change growth of this carnivorous species (Michelotti et al.,
232 2020).

233 Some studies suggest that the activity of digestive enzymes in fish is
234 modulated by the diet and / or the feeding habits of the species (Chan, Horn,
235 Dickson, & Gawlicka, 2004; Drewe, Horn, Dickson, & Gawlicka, 2004; Fernandez,
236 Moyano, Diaz, & Martinez, 2001; Langeland, Lindberg, & Lundh, 2013; Solovyev,
237 Kashinskaya, Izvekova, Gisbert, & Glupov, 2014). However, other studies refute this
238 hypothesis (Almeida et al., 2018; López-Vásquez, Castro-Pérez, & Val, 2009). We
239 can hypothesize that the activity of digestive enzymes behaves in a compensatory
240 manner, ie, being more active on lower digestibility compounds in order to improve
241 the absorption of these nutrients. According to Garcia et al. (2018), *M. liza* has the
242 ability to enrich its diet depending on the habitat in which it operates. This brings us
243 to a high plasticity regarding digestive enzymes.

244 Improvement in digestion by stimulating the secretion of digestive enzymes is
245 a possible mechanism of action of EOs (Mitsch et al., 2004). In the present study,
246 mullets fed the highest citral supplementation presented higher activity of pepsin and
247 amylase than fish fed the control diet, which could explain the higher weight gain of
248 his fish. However, dietary citral supplementation (0.5 mL/kg of feed) increased

249 pepsin, amylase and lipase activities but reduced growth of common snook
250 (Michelotti et al., 2020). Apparently, mullet has more flexibility on its digestive
251 processes than the carnivorous common snook, which can justify this difference on
252 citral effect.

253 The higher lactate level in the liver and muscle of fish fed 2 mL citral per kg of
254 feed can be explained by a possible stimulation of the microintestinal flora caused by
255 the highest dietary citral level. A lower dietary citral supplementation (0.25 mL citral
256 per kg of feed) altered bacterial population in the intestine of silver catfish (Sutili et
257 al., 2019). The gastrointestinal flora has lactic acid bacteria that produce lactate as a
258 product of its metabolism (fermentation). Lactic acid bacteria have already been
259 tested as probiotics for fish and showed effects in several species such as snooks,
260 *Centropomus spp.* (Barbosa et al., 2011), tilapia, *Oreochromis spp.* (Jatobá et al.,
261 2011) and shrimps, *Litopenaeus vannamei*, (Vieira et al., 2007), due to their ability to
262 colonize the digestive tract, altering dominance of intestinal microbiota and promoting
263 improvement in the immune system of animals (Carnevali et al., 2006; Jatobá et al.,
264 2008; Vieira et al., 2008). Homeostatic changes in intestinal function may be
265 influenced by probiotic bacteria, natural bioactive products and dietary components
266 (Abid et al., 2013; Balcázar et al., 2008; Burr, Gatlin III, & Ricke, 2005; Burrells,
267 Williams, Southgate, & Wadsworth, 2001; Ringø et al., 2010; Romarheim, Øverland,
268 Mydland, Skrede, & Landsverk, 2010).

269 Our study meets a growing demand for growth promoters with greater
270 biodegradability and lower environmental impact both in their manufacture and in the
271 residual effect. In conclusion, 2 mL citral per kg of feed is benefic for mullet growth
272 and digestive activity and can be recommended as a food additive for this species.

273

274 **References**

- 275 Abid, A., Davies, S. J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., ...
276 Merrifield, D. L. (2013). Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon
277 (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish &*
278 *Shellfish Immunology*, 35(6), 1948–1956.
- 279
280 Akbary, P., & Kakoolaki, S. (2019). Growth, hematological, innate immune responses
281 of *Mugil cephalus* fed with *Echinacea purpurea*-supplemented diet against
282 *Photobacterium damsela* infections. *International Journal of Environmental Science*
283 *and Technology*, 16(1), 325–334.
- 284
285 Akbary, Paria, & Aminikhoei, Z. (2018). Effect of water-soluble polysaccharide extract
286 from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity,
287 and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. *Journal of Applied Phycology*,
288 30(2), 1345–1353.
- 289
290 Almeida, A. P. G., Zardo, E. L., Toni, C., Behr, E. R., Picolli da Silva, L., Vieira, J. P.,
291 ... Baldisserotto, B. (2018). Composition of gastrointestinal content, protease and
292 lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (Teleostei:
293 Actinopterygii) with two different feeding habits. *Zoologia*, 35, 1–8.
- 294
295 Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., & Girones,
296 O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from
297 intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1–4), 188–191.
- 298
299 Barbosa, M. C., Jatobá, A., Vieira, F. do N., Silva, B. C., Mourino, J. L. P., Andreatta,
300 E. R., ... Cerqueira, V. R. (2011). Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus*
301 *parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Brazilian Archives of*
302 *Biology and Technology*, 54(4), 795–801.
- 303
304 Bento, M. H. L., Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Lahtinen, S., Nurminen, P.,
305 Saarinen, M. T., ... Fischer, J. (2013). Essential oils and their use in animal feeds for
306 monogastric animals--Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance
307 and food safety: a review. *Veterinarni Medicina*, 58(9).
- 308
309 Bernfeld, P., & Colowick, S. P. (1955). Methods in enzymology. By SP Colowick and
310 NO Kaplan, Academic Press Inc., New York, 149.
- 311 Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and
312 modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1–2), 1–14.
- 313
314 Burr, G., Gatlin III, D., & Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal
315 tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish
316 aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 425–436.
- 317
318 Burrells, C., Williams, P. D., Southgate, P. J., & Wadsworth, S. L. (2001). Dietary
319 nucleotides: a novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water
320 transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).
321 *Aquaculture*, 199(1–2), 171–184.

- 322
323 Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., & Cresci,
324 A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles
325 (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol
326 gene expression. *Aquaculture*, 258(1–4), 430–438.
- 327
328 Carvalho, C. V., Passini, G., Sterzelecki, F.C., Baloi, M.F., Cerqueira, V. R.
329 Maturation, spawning and larviculture of the mullet *Mugil liza* under laboratory
330 conditions. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 43, n. 1, p. 31-36, 2019.
- 331
332 Chan, A. S., Horn, M. H., Dickson, K. A., & Gawlicka, A. (2004). Digestive enzyme
333 activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related
334 prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat.
335 *Journal of Fish Biology*, 65(3), 848–858.
- 336
337 Drewe, K. E., Horn, M. H., Dickson, K. A., & Gawlicka, A. (2004). Insectivore to
338 frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in
339 the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams.
340 *Journal of Fish Biology*, 64(4), 890–902.
- 341
342 Dubois, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related
343 substances. *Analytical chemistry*. 28: 350–358, 1956
- 344
345 Fernandez, I., Moyano, F. J., Diaz, M., & Martinez, T. (2001). Characterization of α -
346 amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei).
347 *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(1), 1–12.
- 348
349 Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants
350 in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*,
351 25(5), 327–340.
- 352
353 Garcia, A. F. S., Garcia, A. M., Vollrath, S. R., Schneck, F., Silva, C. F. M., Marchetti,
354 Í. J., & Vieira, J. P. (2018). Spatial diet overlap and food resource in two congeneric
355 mullet species revealed by stable isotopes and stomach content analyses.
356 *Community Ecology*, 19(2), 116–124.
- 357
358 Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M. H., Ross, N., Opstad, I., & Torrissen, O. J. (2000).
359 Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus*
360 *hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184(3–4), 303–
361 314.
- 362
363 Giannenas, I., Bonos, E., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2013). Essential oils and
364 their applications in animal nutrition. *Med. Aromat. Plants*, 2(140), 412–2167.
- 365
366 Heras, S., Roldán, M. I., & Castro, M. G. (2009). Molecular phylogeny of Mugilidae
367 fishes revised. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(2), 217–231.
- 368
369 Hidalgo, M. C., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes
370 in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*,
371 170(3–4), 267–283.

- 372
373 Hummel, B. C. W. (1959). A modified spectrophotometric determination of
374 chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and*
375 *Physiology*, 37(12), 1393–1399.
- 376
377 HARROWER, J. R., BROWN, C. H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to
378 field collection of microliter samples. *Journal of Applied Physiology*, 32: 709-711,
379 1976.
- 380
381 Jatobá, A., do Nascimento Vieira, F., Buglione-Neto, C. C., Mourino, J. L. P., Silva, B.
382 C., Seiffter, W. Q., & Andreatta, E. R. (2011). Diet supplemented with probiotic for
383 Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and*
384 *Biochemistry*, 37(4), 725–732.
- 385
386 Jatobá, A., Vieira, F. do N., Buglione Neto, C., Silva, B. C., Mouriño, J. L. P.,
387 Jerônimo, G. T., ... Martins, M. L. (2008). Lactic-acid bacteria isolated from the
388 intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*,
389 43(9), 1201–1207.
- 390
391 Kakoolaki, S., Akbary, P., Zorriehzahra, M. J., Salehi, H., Sepahdari, A.,
392 Afsharnasab, M., ... Jadgal, S. (2016). *Camellia sinensis* supplemented diet
393 enhances the innate non-specific responses, haematological parameters and growth
394 performance in *Mugil cephalus* against *Photobacterium damsela*. *Fish & Shellfish*
395 *Immunology*, 57, 379–385.
- 396
397 Langeland, M., Lindberg, J. E., & Lundh, T. (2013). Digestive enzyme activity in
398 Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *J Aquac Res*
399 *Development*, 5(208), 2.
- 400
401 López-Vásquez, K., Castro-Pérez, C. A., & Val, A. L. (2009). Digestive enzymes of
402 eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *Journal of Fish Biology*, 74(7),
403 1620–1628.
- 404
405 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farra, L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement
406 with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- 407
408 Menezes, N. A., Oliveira, C. de, & Nirchio, M. (2010). An old taxonomic dilemma: the
409 identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes:
410 Mugilidae). *Zootaxa*, 2519(5).
- 411 Michelotti, B. T., Passini, G., Carvalho, C., Salbego, J., Cossettin, N., Vieira, R., ...
412 Cerqueira, V. R. (2018). Growth and metabolic parameters of common snook
413 juveniles raised in freshwater with different water hardness. *Aquaculture*, 482(August
414 2017), 31–35.
- 415
416 Michelotti, B. T., Mori, N. C., Magnotti, C. C. F., Heinzmann, B. M., Almeida, A. P. G.,
417 Cerqueira, V. R., & Baldisserotto, B. (2020). Citral as food additive for common
418 snook-zootechanical parameters and digestive enzymes. *Ciência Rural*, 50(4).
- 419
420 Mori, N. C., Michelotti, B. T., da Silva Pês, T., Bressan, C. A., Sutili, F., Kreutz, L. C.
421 Cerqueira, V. R. (2019). Citral as a dietary additive for *Centropomus undecimalis*

- 422 juveniles: Redox, immune innate profiles, liver enzymes and histopathology.
423 Aquaculture, 501, 14–21.
- 424
- 425 Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Köhler, B., Gabler, C., Losa, R., & Zimpernik, I. (2004).
426 The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of
427 *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*, 83(4),
428 669–675.
- 429
- 430 Nunes, J. O., Bertechini, A. G., Brito, J. Á. G. de, Fassani, É. J., Mesquita, F. R.,
431 Makiyama, L., & Meneghetti, C. (2012). Evaluation of the use of probiotic (*Bacillus*
432 *subtilis* C-3102) as additive to improve performance in broiler chicken diets. *Revista*
433 *Brasileira de Zootecnia*, 41(11), 2374–2378.
- 434
- 435 Park, J. T., & Johnson, M. J. (1949). A submicrodetermination of glucose. *Journal of*
436 *Biological Chemistry*, 181, 149–151.
- 437
- 438 Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., ...
439 Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract
440 of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451–467.
- 441
- 442 Romarheim, O. H., Overland, M., Mydland, L. T., Skrede, A., & Landsverk, T. (2010).
443 Bacteria grown on natural gas prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic
444 salmon. *The Journal of Nutrition*, 141(1), 124–130.
- 445
- 446 Saddiq, A. A., & Khayyat, S. A. (2010). Chemical and antimicrobial studies of
447 monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(1), 89–93.
- 448
- 449 Siccha-Ramirez, R., Menezes, N. A., Nirchio, M., Foresti, F., & Oliveira, C. (2014).
450 Molecular identification of mullet species of the Atlantic South Caribbean and South
451 America and the phylogeographic analysis of *Mugil liza*. *Reviews in Fisheries*
452 *Science & Aquaculture*, 22(1), 86–96.
- 453
- 454 Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Izvekova, G. I., Gisbert, E., & Glupov, V. V.
455 (2014). Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five
456 freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 85(5), 1395–1412.
- 457
- 458 Souza, C., Baldissera, M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B., Martos-Sitcha, J. A., &
459 Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture:
460 A review. *Frontiers in Physiology*, 10, 785.
- 461 Sutili, F. J., Kreutz, L. C., Flores, F. C., da Silva, C. D. B., Kirsten, K. S., Voloski, A.
462 P. D. S., ... & Baldisserotto, B. (2019). Effect of dietary supplementation with citral-
463 loaded nanostructured systems on innate immune responses and gut microbiota of
464 silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Journal of Functional Foods*, 60, 103454.
- 465
- 466 Thompson, G., Fortunato, R. C., Chiesa, I., & Volpedo, A. (2015). Trophic ecology of
467 *Mugil liza* at the southern limit of its distribution (Buenos Aires, Argentina). *Brazilian*
468 *Journal of Oceanography*, 63(3), 271–277.
- 469
- 470 Vieira, F. do N., Buglione Neto, C. C., Mouriño, J. L. P., Jatobá, A., Ramirez, C.,
471 Martins, M. L., ... Vinatea, L. A. (2008). Time-related action of *Lactobacillus*

472 *plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as
473 immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(6), 763–769.

474

475 Vieira, F. do N., Pedrotti, F. S., Buglione Neto, C. C., Mouriño, J. L. P., Beltrame, E.,
476 Martins, M. L., ... Arana, L. A. V. (2007). Lactic-acid bacteria increase the survival of
477 marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian*
478 *Journal of Oceanography*, 55(4), 251–255.

479

480 Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as
481 feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and*
482 *Biotechnology*, 6(1), 7.

483

484 Zeppenfeld, C. C., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Salbego, J., Koakoski, G., dos
485 Santos, A. C., ... Baldisserotto, B. (2017). *Aloysia triphylla* essential oil as food
486 additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. *Aquaculture*
487 *Nutrition*, 23(6), 1362–1367.

488

489 Zeppenfeld, C C, Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Cunha, M. A.,
490 Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed
491 additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*,
492 22(4), 933–940.

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510 **TABLES**

511

512 Table 1 - Formulation (%) of the experimental diet and

513 analyzed proximate mean composition

Ingredients	g kg⁻¹
Starch	140
Soy lecithin	10
Vitamins and minerals (premix)*	5
Fresh squid	120
Fish meal	700
Fish oil	24
Vitamin C	1
Composition	(%)
Dry matter content	94.32
Protein	53.73
Ether extract	9.19
Mineral matter	20.73
Acid detergent fiber	2.04
Neutral detergent fiber	14.31

514

515 *Vitamin and mineral mixture (security levels per kilogram of product) — folic acid:

516 250 mg, pantothenic acid: 5,000 mg, antioxidant: 0.60 g, biotin: 125 mg, cobalt: 25

517 mg, copper: 2000 mg, iron: 820 mg, iodine: 100 mg, manganese: 3750 mg, niacin:

518 5000 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1,000,000 UI, vitamin B1: 1250 mg, vitamin

519 B12: 3750 mcg, vitamin B2: 2500 mg, vitamin B6: 2485 mg, vitamin C: 28,000 mg,

520 vitamin D3: 500,000 UI, vitamin E: 20,000 UI, vitamin K: 500 mg, zinc: 17,500 mg.

521 Table 2 - Glucose and lactate levels in the muscle and liver of *Mugil liza* fed different
 522 dietary citral levels. Values are expressed as mean \pm standard error. Different letters
 523 indicate significant difference between treatments (one-way ANOVA and Tukey test,
 524 P <0.05).

525

CITRAL (mL per kg of feed)				
	0.0 (control)	0.5	1.0	2.0
GL	312.4 ± 15.02^a	197.31 ± 9.27^b	272.11 ± 32.24^{ab}	327.82 ± 26.16^a
GM	187.83 ± 11.02^a	212.13 ± 5.53^a	203.1 ± 23.94^a	240.49 ± 20.29^a
LL	1.38 ± 0.19^a	1.84 ± 0.05^{ab}	1.70 ± 0.08^{ab}	2.24 ± 0.11^b
LM	3.48 ± 0.35^a	1.79 ± 0.24^b	1.95 ± 0.27^b	2.33 ± 0.17^{ab}

526 GL- glucose in the liver, GM- glucose in the muscle, LL- lactate in the liver, LM-
 527 lactate in the muscle. All parameters are in $\mu\text{mol g tissue}^{-1}$.

528

529

530

531

532

533

534

535

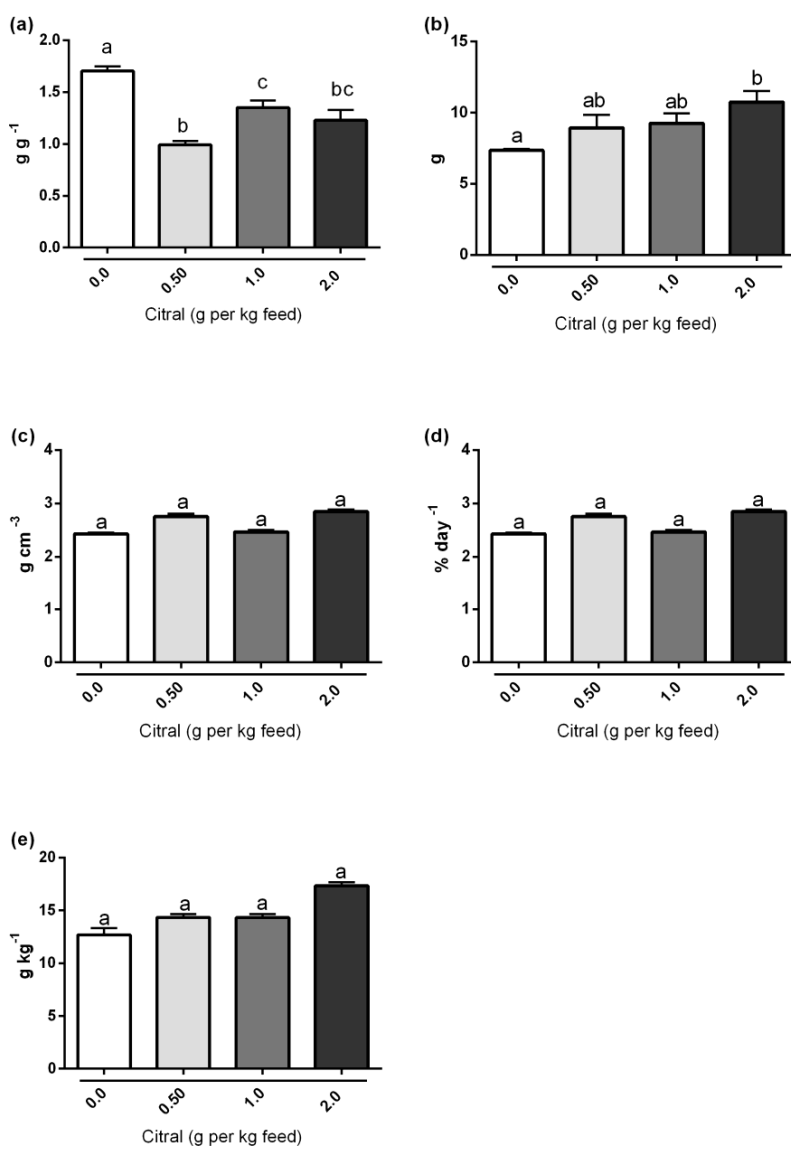
536

537

538 FIGURE CAPTIONS

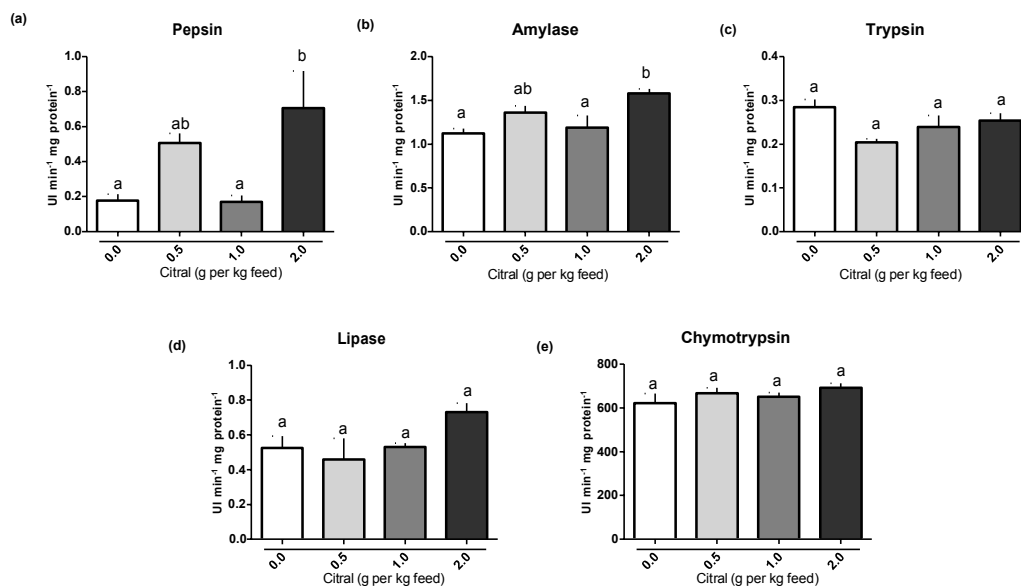
539

540 Figure 1 - Zootechnical parameters of mullet, *Mugil Liza* fed 45 days with feed
541 supplemented with different levels of citral. (a) feed conversion ratio, (b) weight gain,
542 (c) condition factor, (d) standard growth rate, (e) individual feed intake. Different
543 letters indicate significant differences between the treatments using one-way ANOVA
544 and Tukey's test ($p < 0.05$)



545

546 Figure 2 Digestive enzyme activity in the stomach: (a) pepsin and intestine (b)
 547 amylase, (c) trypsin, (d) lipase, (e) chymotrypsin of mullet, *Mugil Liza* fed 45 days
 548 with feed supplemented with different levels of citral. Different letters indicate
 549 significant differences between the treatments using one-way ANOVA and Tukey's
 550 test ($p < 0.05$)



551
 552 Digestive enzyme activity in the stomach (pepsin – a) and intestine (amylase – b,
 553 trypsin – c, lipase – d, chymotrypsin – e) of mullet, *Mugil Liza* fed 45 days with feed
 554 supplemented with different levels of citral. Different lowercase letters indicate
 555 significant difference between the treatments using one-way ANOVA and Tukey's
 556 test ($p < 0.05$)

557

558

559

560

7 DISCUSSÃO GERAL

Devido à diferença de plasticidade gastrintestinal das espécies estudadas, esperava-se ocorrência de diferenças tanto de aproveitamento dos alimentos, quanto ao que se refere à absorção e aos efeitos do citral no organismo dos peixes em relação aos parâmetros testados. Tal hipótese foi confirmada, pois no menor nível de inserção de citral, o robalo (carnívoro) apresentou valores mais baixos dos parâmetros zootécnicos, ao passo que a sardinha (onívora) não apresentou qualquer diferença estatística em relação a esses parâmetros. A tainha (detritívora), por sua vez, submetida ao maior nível de inserção de citral, apresentou maior ganho de peso em relação ao grupo controle.

Por terem uma dieta bastante variável, os onívoros são considerados mais aptos à flexibilidade adaptativa do trato digestório que os carnívoros, que possuem uma alimentação mais restrita e uma menor capacidade de modulação gastrintestinal. Peixes onívoros e fitoplantófagos ingerem alimentos de menor digestibilidade e apresentam, em geral, intestinos mais longos se comparados aos peixes carnívoros (ROTTA, 2003).

Portanto, relacionado a este trabalho existem duas adaptações gerais, conforme o hábito alimentar:

a) os herbívoros, que apresentam uma grande ingestão de alimentos e um célere trânsito intestinal, motivo pelo qual possuem superfície absorptiva distribuída em um longo intestino com mucosa pouco pregueada, o que permite que o alimento permaneça mais tempo em contato com as enzimas, com o intuito de aumentar a eficácia da digestão, compensando o baixo valor nutritivo do alimento ingerido; e

b) os carnívoros, que, apesar de apresentarem intestino curto, possuem trânsito intestinal mais lento, o que favorece a difusão dos nutrientes para dentro das numerosas e profundas pregas que existem na mucosa intestinal antes de serem absorvidos, bem como ingerem alimentos de maior qualidade nutricional (ROTTA, 2003).

No que tange às tainhas, os resultados foram os seguintes: a) submetidas ao tratamento 0,5 mL de citral por kg de ração, apresentaram redução na glicose hepática; b) submetidas ao tratamento de 2,0 mL de citral por kg de ração, obtiveram alto valor de lactato hepático, bem como maior ganho de peso. Considerando que a tainha é um peixe detritívoro, é possível que as bactérias e os protozoários existentes nas partículas de detritos ingeridos tenham funcionado como fonte essencial de nutrientes aos animais, sendo importantes também pela participação na decomposição de material vegetal (ODUM, 1970). Não se pode, portanto,

descartar a hipótese desses microorganismos terem influenciado na resposta dessa espécie à adição de citral na ração.

Os fitoquímicos também podem ter exercido um efeito semelhante ao prebiótico no ambiente intestinal, modulando a composição bacteriana do intestino (LAPARRA; SANZ., 2010). Isso porque eles podem agir diretamente na população bacteriana, por meio de diferentes mecanismos de ação (causando danos à membrana bacteriana ou suprimindo fatores de virulência), inibindo a atividade de enzimas e toxinas e a formação de biofilme bacteriano (BARBIERI et al., 2017). Essas moléculas bioativas podem induzir mudanças positivas na morfologia intestinal, bem como fornecer atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, os fitoquímicos também influenciam a quantidade e o tipo de secreções produzidas pela mucosa intestinal, alterando as propriedades físicas e químicas do ambiente intestinal (SUTILI et al., 2018).

Entende-se-se, portanto, que, apesar de seus efeitos multi-benéficos, o citral continua sendo uma molécula instável, principalmente em ambientes ácidos e não solúvel em água (WEERAWATANAKORN et al., 2015).

As sardinhas demonstraram diferença de morfologia intestinal, pois apresentaram aumento de profundidade de criptas e maior diâmetro de vilosidades nos diferentes tratamentos aos quais foram submetidas. Como a ingestão ocorreu na forma oral, no caso do presente estudo, implementado na ração, espera-se que o composto bioativo venha a ser absorvido no trato gastrintestinal, mais precisamente no intestino. O fato de a tainha e a sardinha possuírem um maior comprimento de intestino em relação ao robalo faz com que o citral tenha mais tempo de contato e absorção nessas espécies. A função intestinal também está correlacionada com a dieta natural entre os peixes: peixes herbívoros possuem maior capacidade intestinal para processar e absorver glicose que peixes carnívoros (DAY; TIBBETTS; SECOR, 2014; GERMAN; HORN, 2006; HIDALGO; UREA; SANZ., 1999), enquanto também exibem taxas mais baixas de captação intestinal de prolina em comparação com espécies carnívoras (BUDDINGTON; CHEN; DIAMOND, 1987) .

Houve uma resposta em comum em todos os experimentos: maior atividade de uma ou mais enzimas digestivas.

No tocante à flexibilidade fenotípica do trato gastrintestinal, em resposta às alterações na dieta, apesar de ocorrer nos diferentes hábitos alimentares, a mesma se destaca em onívoros e herbívoros (BALDISSEROTTO, 2013). A característica mais evidente de modulação morfofisiológica em peixes é a variação do comprimento do trato gastrintestinal (FRACALOSSO; CYRINO, 2013). A plasticidade intestinal é um mecanismo apresentado por

esses indivíduos frente à diversificada alimentação para adequar o trato a fim de obter uma melhor absorção (DABROWSKI; PORTELLA, 2005), considerando que a grande maioria das espécies é oportunista, alimentando-se de itens disponíveis no meio em que se encontram (NRC, 2011). Sutili et al (2019) testaram citral na alimentação para o jundiá e verificaram que houve uma redução do pH do estômago e um aumento do pH do intestino, assim como uma redução da população bacteriana total no intestino dos peixes. Essa alteração de pH também pode influenciar a atividade das enzimas digestivas, fazendo com que aumentem ou diminuam sua atividade.

8 CONCLUSÃO

De acordo com o material apresentado, conclui-se que o citral, utilizado como aditivo na ração para peixes, é benéfico, e indicado para espécies de intestino longo, como a tainha e não indicado para peixes de intestino curto, como o robalo. Acrescenta-se que diante das diferentes respostas das espécies aos tratamentos aos quais foram submetidas, a estratégia de suplementação na dieta da sardinha, com maior tempo de exposição, aparece como um caminho interessante para trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- ALBIERI, R.J.; ARAÚJO, F.G. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. **Revista Zoologia**, v.27, n.3, p.331-340, 2010.
- ALMEIDA, A. P. G., et al. Composition of gastrointestinal content, protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (Teleostei: Actinopterygii) with two different feeding habits. **Revista Zoologia** (Curitiba), v. 35, p. 1-8, 2018.
- ALMEIDA, P. R. et al. The feeding strategies of *Liza ramada* (Risso, 1826) in fresh and brackish water in the River Tagus, Portugal. **Journal of Fish Biology**, v. 42, n. 1, p. 95-107, 1993.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus SPP.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research**, 39: 684-700, 2008.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. S., CERQUEIRA, V. R.; SILVA, I. D., ARAÚJO, J.; REIS, M. A. Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society**, 33: 506-516, 2002.
- ANDRADE, H. A.; SANTOS, J. A. T. Seasonal trends in the recruitment of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) to the fishing ground in the southwest Atlantic. **Fisheries research**. v. 66, n. 2-3, p. 185-194, 2004.
- ANDREATTA, E. R.; ROCHA, I. P. ; RODRIGUES, J. B. R. **Ensaio sobre desova induzida da tainha, *Mugil brasiliensis* Spix et Agassiz**. In: Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. p. 463-468, 1981.
- BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 909-913, 2011.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: [s.n.], 2013.
- BALOI, M. et al. **Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis***. **Aquaculture Research**. v. 47, n. 2, p. 554-560, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/are.12514>>.
- BALOI, M. F. et al. Growth performance, body composition and metabolic response to feeding rates in juvenile Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**. v. 23, n. 6, p. 1458-1466, 2017.
- BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological research**. v. 196, p. 44-68, 2017.
- BARROSO, M.V. et al. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (*Centropomus*

parallelus). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, p.2157-2164, 2002.

BENETTI D.D.; FAGUNDES NETTO, E.B. Desova, larvicultura e criação de tainhas. In: Manual de Maricultura. Ministério da Marinha - **Instituto de Pesquisas da Marinha, Rio de Janeiro**, pp. 57, 1983.

BENETTI, D. D.; FAGUNDES NETTO, E. B. Considerações sobre desova e alevinagem da tainha (*Mugil Liza Valenciennes*, 1836). Rio de Janeiro: **Instituto de Pesquisas da Marinha**, v.135, 26 p., 1980.

BENTO, M. H. L. et al. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals- Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 9, 2013.

BLABER, S. J. M. Factors affecting recruitment and survival of mugilids in estuaries and coastal waters of southeastern Africa. **American Fisheries Society Symposium**, 1: 507-518, 1987.

BLAY JR, J.; AWITTOR, W. K.; AGBEKO, D. Seasonal variation in food preference and feeding ecology of two juvenile marine fishes, *Pseudolithus senegalensis* (Sciaenidae) and *Brachydeuterus auritus* (Haemulidae) off Cape coast, Ghana. **West African Journal of Applied Ecology**, v. 9, n. 1, 2006.

BRASIL., Diário Oficial da União. **Portaria SAP/MDIC n. 4**. 24 de junho de 2017. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19145882/do1-2017-06-29-portaria-sap-mdic-n-4-de-27-de-junho-de-2017-19145803, acesso em 10/01/2020.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.

BRUSLE, J. **Sexuality and biology of reproduction in grey mullets**. International Biological Programme, 1981.

BUDDINGTON, B. Y. R. K.; CHEN, J. W.; DIAMOND, J. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal. **The Journal of Physiology**. p. 261-281, 1987.

CAVALLI, R., DOMINGUES, E., HAMILTON, S. Development of open ocean marine fish farming in Brazil: possibilities and constraints. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40: 155-164, 2011.

CAVALLI, R.O., HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.6, p.64-69, 2009.

CERQUEIRA V.R. **Cultivo de peixes marinhos**. In: Aquicultura experiências brasileiras (ed. by Poli, C.R., Poli, A.T., Andreatta, E.R., Beltrame, E.). Editora UFSC, Florianópolis/SC p.369-406, 2004.

CERQUEIRA, V. R., MIOSO, R., & CANARIN, M. Indução de desova com fertilização natural e artificial e incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*). **Atlântica**

(Rio Grande), 27(1), 31-38, 2005.

CERQUEIRA, V. R. et al. Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 94-102, 2017.

CERQUEIRA, V.R. et al. **Cultivo de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) e robalo-peva (*Centropomus parallelus*)**. In: BALDISSEROTTO, B. (org.) Espécies nativas para piscicultura. Editora da UFSM, Santa Maria. pp. 449-474, 2020.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. **Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil**. [S.l.]: [s.n.], 2011a.

CERGOLE, M. C; SACCARDO, S. A; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 50, n. UNICO, p. 13-26, 2002.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela**. 2nd edn, Vol. II. Caracas, Venezuela: Fundacion Cientifica Los Roques, 1993.

CHAVES, P. DE T. DA C.; VAZZOLER, C. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Semaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). **Acta Amazonica**, v. 14, n. 3-4, p. 343-354, 1984.

CONCHA-FRÍAS, B. et al. **Dietary protein requirement in common snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles reared in marine and brackish water**. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. v. 5 (13), 45-54, 2018.

CORREA, C. F.; CERQUEIRA, V. R. Stocking Densities for Fat Snook Juveniles After Larviculture. **Boletim Do Instituto De Pesca**, v. 34, n. 4, p. 571-576, 2008.

COSTA FILHO, J., FABREGAT, T., ROSA, C. A review of major aspects of snook breeding. **Revista de Ciencias Agroveterinarias**, 12 (3): 317-325, 2013.

DALLAGNOLO, R.; SCHWINGEL, P. R.; PEREZ, J. A. A. Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) anual production forecasting in santa catarina: a catch projection model from monthly landing patterns. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, 2010. v. 14, n. 2, p. 95-104.

DABROWSKI, K.; PORTELLA, M. C. **Feeding plasticity and nutritional physiology in tropical fishes**. *Fish physiology*, 2005. v. 21, p. 155-224.

DAY, R. D.; TIBBETTS, I. R.; SECOR, S. M. Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, 2014. v. 184, n. 4, p. 497-512

DÍAZ, A. O. et al. Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, n. 6, p. 341-346, 2003.

- DURAND, J.D. et al. Systematic of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. **Mol. Phylogenet. Evol.** 64(1): 79-92, 2012.
- ESQUIVEL G., J.R.; ESQUIVEL, B.M. Utilização do robalo (*Centropomus parallelus*) no controle da superpopulação de Tilapias. In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, 12, Aquicultura Brasil 2002, Caderno de resumos. Goiânia, ABRAq, 2002, p. 198.
- FAO. **the State of World Fisheries and Aquaculture**. [S.l.]: [s.n.], 2016.
- JABLONSKI, S. The Brazilian sardine. Is there any room for modelling. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 2007. v. 2, n. 2, p. 86–93.
- FARIAS, J. L., et al. Tolerância e crescimento de juvenis do robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*, Bloch 1972) expostos a diferentes salinidades. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 3, p. 54-60, 2017.
- FERREIRA, T. M. et al. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 118–125, 2009.
- FERREIRA, F. A. **Desenvolvimento do produto tipo caviar a base de ovas de tainha (*Mugil platanus*)**. 2006, 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento Química, Brasil, 2006.
- FERNANDEZ, I. et al. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, n. 1, p. 1–12, 2001.
- FERRAZ, E.M. et al. Influência da temperatura de cultivo sobre o crescimento e diferenciação sexual de robalo-peva, *Centropomus parallelus* Poey, 1860. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luiz, v.6, p.1-16, 2011.
- FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.36, p.73-83, 2010.
- FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013.
- FRAGA, E. et al. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 5, p. 598–604, 2007.
- FRANCO, L.; BASHIRULLAH, K. M. B. Alimentación de la Lisa (*mugil curema*) del golfo de Cariaco-estado sucre, Venezuela. **Zootecnia Tropical** (Venezuela), v. 10, n. 2, p. 219–238, 1992.
- FRANZ, C.; BASER, K. H. C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal

feeding—a European perspective. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 327–340, 2010.

FROESE, R.; D. PAULY. FishBase. 2008. Disponível online em: <http://www.fishbase.org>. [Accessed: 20\03\2019]

GALVÃO, M. S. N., FENERICH-VERANI, N., YAMANAKA, N., & da Rocha OLIVEIRA, I. Histologia do sistema digestivo da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 24(único), 91-100, 2018.

GAUTIER, D.; HUSSENOT, J. **Les mulets des mers d'Europe: synthèse des connaissances sur les bases biologiques et les techniques d'aquaculture**. Éditions Quae, 2005.

GERMAN, D. P.; HORN, M. H. Gut length and mass in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. **Marine Biology**. v. 148, n. 5, p. 1123–1134, 2006.

GIANNENAS, I. et al. Essential oils and their applications in animal nutrition. **Med. Aromat. Plants**, v. 2, n. 140, p. 412–2167, 2013.

GODA, A. M. A. S. Effect of Dietary Ginseng Herb (Ginsana G115) Supplementation on Growth, Feed Utilization, and Hematological Indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), Fingerlings. **Journal of the World Aquaculture Society** 39(2):205–214, 2008.

GODINHO, H. M. Tainha. Baldisseroto, B. E Gomes, L. C (Org). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. UFSM, Santa Maria, p. 433–441, 2005.

GODINHO, H. M. et al. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim Instituto Pesca**, v.20, 59-66, 1993.

GRACIA-LÓPEZ, V.; GARCÍA-GALANO, T.; GAXIOLA-CORTÉS, G.; PACHECO-CAMPOS, J. Efecto del nivel de proteína en la dieta y alimentos comerciales sobre el crecimiento y la alimentación en juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). **Ciencias marinas** , 29 (4b), 585-594, 2003.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M.-S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, n. 1–4, p. 1–15, 2011.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. **Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits**. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**. v. 170, n. 3–4, p. 267–283, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X)>.

JOBLING, M. Influences of food particle size and dietary energy content on patterns of gastric evacuation in fish: test of a physiological model of gastric emptying. **Journal of Fish Biology**, v. 30, n. 3, p. 299–314, 1987.

JUNIOR, H. A. et al. Monocultivo de robalo *Centropomus parallelus* em água doce. REDVET. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 10, n. 10, 2009.

- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.
- KURTZ, F. W.; MATSUURA, Y. Food and feeding ecology of Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) larvae from the southeastern Brazilian Bight. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 49, n. 1–2, p. 60–74, 2001.
- LAFFAILLE, P. et al. Role of fish communities in particulate organic matter fluxes between salt marshes and coastal marine waters in the Mont Saint-Michel Bay. **Hydrobiologia**, v. 373, p. 121–133, 1998.
- LAFFAILLE, P. et al. Can thin-lipped mullet directly exploit the primary and detritic production of European macrotidal salt marshes? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 54, n. 4, p. 729–736, 2002.
- LANGELAND, M.; LINDBERG, J. E.; LUNDH, T. Digestive enzyme activity in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **J Aquac Res Development**, v. 5, n. 208, p. 2, 2013.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological research**, 2010. v. 61, n. 3, p. 219–225.
- LEFEUVRE, J.-C.; LAFFAILLE, P.; FEUNTEUN, E. Do fish communities function as biotic vectors of organic matter between salt marshes and marine coastal waters? **Aquatic Ecology**, v. 33, n. 3, p. 293–299, 1999.
- LEMOS, V. M. et al. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology** 85(3): 671–687. 2014.
- LÓPEZ-VÁSQUEZ, K.; CASTRO-PÉREZ, C. A.; VAL, A. L. Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 7, p. 1620–1628, 2009.
- MEDEIROS F, E.; CERQUEIRA, V. R. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 2, p. 73–83, 2018.
- MENEZES N, A.; FIGUEIREDO J, L. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1985.
- MENEZES, N. A.; OLIVEIRA, C. DE; NIRCHIO, M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v. 2519, n. 5, 2010.
- MENEZES, N. A. et al. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. 2015.
- MPA; MMA. **Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes**,

1836, no sudeste e sul do Brasil. (eds MPA; MMA), Brasília pp. 238. 2015.

MICHELOTTI, B. T. et al. Growth and metabolic parameters of common snook juveniles raised in freshwater with different water hardness. **Aquaculture** v. 482, n. August 2017, p. 31–35, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.029>>.

MIRANDA-FILHO, K. et al. Tainha. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**, Editora UFSM, Santa Maria, Brasil, p. 541–552, 2010.

MIRANDA-FILHO, K. C.; WASIELESKY-JR, W.; MAÇADA, A. P. Efeito da amônia e nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* (Pisces, Mugilidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 45–50, 1995.

MONTES, M. De L. A. H. Nota sobre alimentação de alevinos da "sardinha legítima" ou "verdadeira": *Sardinella aurita* Cuvier & *Valenciennes*. **Boletim do Instituto Oceanográfico**. v. 4, n. 1–2, p. 161–180, 1953.

NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Animal Nutrition Series. The National Academy Press, Washington, D.C, 2011. 392p.

NUNES, J. O. et al. Evaluation of the use of probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102) as additive to improve performance in broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 11, p. 2374–2378, 2012.

ODUM, W. **Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the**. Marine food chains. [S.l.]: [s.n.], p. 222, 1970.

OKAMOTO, M. H.; DE SAMPAIO, L. A. N.; DE PINHO MAÇADA, A. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 28, n. 1, p. 61–66, 2006.

OLIVEIRA, I. R.; SOARES, L. S. H. Alimentação da tainha *Mugil platanus*, Gunther 1880 (*Pisces Mugilidae*) da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. **Boletim Instituto Pesca**, v. 23, 95-104, 1996.

OSTINI, S. et al. Rearing of fat snook (*Centropomus parallelus*) at different stocking densities. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.8, p.250-257, 2007.

ORTIZ, M. I. et al. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 10, p. 1691–1697, 2010

PASSINI, G. et al. Reprodução e larvicultura da tainha *Mugil liza* no Estado de Santa Catarina. In: **Feira Nacional do Camarão, 12, Latin American and Caribbean Aquaculture** Fortaleza. Abstract Book... Fortaleza: ABCC, 2015. p.410, 2015.

PERIN, S.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M. Morphometry and relative growth of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) in the southeastern Brazilian bight. **Arquivos de Zoologia**. v. 45, p. 63–72, 2014.

PILLAY, T. V. R. Structure and development of the scales of five species of grey mullet of

Bengal. **Proceedings of the National Institute of Science India** 17: 413- 424, 1953.

PONCE-MONTER, H., et al. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. **Journal of smooth muscle research**, v. 46, n. 6, p. 309-319, 2010.

RAMPELOTTO, C. et al. Supplementation with microencapsulated lemongrass essential oil improves protein deposition and carcass yield in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 40, p. 1–8, 2018.

REIS, E. G.; D'INCAO, F. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. **Ocean & Coastal Management**, v. 43, n. 7, p. 585–595, 2000.

RIVAS, L.R. **Systematic review of the perciform fishes of the genus Centropomus**. Copeia, Lawrence, v.3, p.579-611, 1986.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E), 2003.

SAMPAIO, L. A. N.; FERREIRA, A. H. F.; TESSER, M. B. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). 2001.

SAMPAIO, L. A.; WASIELESKY, W.; MIRANDA-FILHO, K. C. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 5, p. 668–674, 2002.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, M. R. Extratos Vegetais Como Aditivos Em Rações Para Peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, p. 789–800, 2009.

SANTOS, A. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 62, p. 213-216, 2017.

SCHNEIDER, F.; SCHWINGEL, P. R. A preliminary study on the trofic ecology of *sardinella brasiliensis* off southern Brazil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, 2000.

SCHWEIGERT, J. F. **Update COSEWIC status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada**. COSEWIC assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada, Ottawa, p. 1–19, 2002.

SENINA, I.; SIBERT, J.; LEHODEY, P. Parameter estimation for basin-scale ecosystem-linked population models of large pelagic predators: application to skipjack tuna. **Progress in Oceanography**. v. 78, n. 4, p. 319–335, 2008.

SILVA, S. S.; WIJEYARATNE, M. J. S. 1977. Studies on the biology of Young grey mullet, *Mugil cephalus* L. II. Food and Feeding. **Aquaculture**, 122: 157-167, 1977.

SILVA, S. S. Biology of juvenile grey mullet: a short review. **Aquaculture** 19: 21-36, 1980.

SILVA-ANGULO, A. B. et al. Comparative study of the effects of citral on the growth and injury of listeria innocua and listeria monocytogenes cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2015.

SILVA JÚNIOR, R. F. **Digestibilidade de ingredientes proteicos e energéticos para o robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) e seus efeitos no perfil das enzimas digestivas**. 2016.212 p. Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Curso de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, V. N. Efeito de altas temperaturas no crescimento e nas respostas fisiológicas ao estresse de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*). Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2016.

SOUZA, J.H. et al. Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p.190-195, 2011.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 697–702, 2015.

STERZELECKI, F. C et al. Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). **Aquaculture research**. v. 48, n. 9, p. 5111–5121, 2017.

STERZELECKI, F. C et al. Efeitos do aumento do nível de proteína no desempenho, atividade enzimática e composição corporal da sardinha brasileira, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). **Nutrição aquícola**, v. 24, n. 1, p. 366-374, 2018.

SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 3, p. 716–726, 2018.

SUTILI, F. J. et al. Effect of dietary supplementation with citral-loaded nanostructured systems on innate immune responses and gut microbiota of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103454, 2019.

SUTILI, F. J. et al. Plant essential oils as fish diet additives: Benefits on fish health and stability in feed. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–11, 2017.

TAVARES, L.R.E.; LUQUE, J.L. Community ecology of metazoan parasites of the later juvenile common snook centropomus undecimalis (*Osteichthyes: Centropomidae*) from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.64, p.523-529, 2004.

TAYLOR, R.G. et al. Spawning rhythms of common snook in Florida. **Journal of Fish Biology**, London, v.53, p.502-520, 1998.

TSUZUKI, M.Y. et al. Growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* in cages at three stocking densities. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.34, p.319-324, 2009.

TSUZUKI, M.Y.; BERESTIAS, A.C. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.34, p.535- 541, 2008.

VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (mill.) N.E. **Brown. Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709–714, 2002.

VIEIRA, J.P. Juvenile mullets (*Pisces: Mugilidae*) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS Brazil. **Copeia** 1991, 409–418, 1991.

VIEIRA, J.P.; SCALABRIN, C. Migração reprodutiva da Tainha (*Mugil platanus*, Günther, 1880) no sul do Brasil. **Atlantica** 13, 131–141, 1991.

ZAGO, D. C. et al. Aloysia triphylla in the zebrafish food: effects on physiology, behavior, and growth performance. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 2, p. 465-474, 2018.

ZENG, Z. et al. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Essential oil of Aloysia triphylla as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 4, p. 933–940, 2016.

ZEPPENFELD, C. C. et al. Aloysia triphylla essential oil as food additive for *Rhamdia quelen* – Stress and antioxidant parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1362–1367, 2017.

ZHANG, H. et al. Inhibitory Effects of Citral, Cinnamaldehyde, and Tea Polyphenols on Mixed Biofilm Formation by Foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 927–933, 2014.

ZHENG, Z.L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum*) on growth, antioxidant, effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, 292, 214–218, 2009.

YANG, Y. et al. Functional assessment of encapsulated citral for controlling necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 95, n. 4, p. 780–789, 2016.

WEERAWATANAKORN, M. et al. Reactivity and stability of selected flavor compounds. **journal of food and drug analysis**. v. 23, n. 2, p. 176–190, 2015.

WINDELL, J. T. Food analysis and rate of digestion. In **Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters**.(Ed. WE Ricker) pp. 197–203. 1968.