

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

**ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL)
N. E. BROWN NA DIETA DO JUNDIÁ: ANÁLISE DO
CRESCIMENTO E DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Etiane Medianeira Hundertmarck Saccol

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL) N. E.
BROWN NA DIETA DO JUNDIÁ: ANÁLISE DO
CRESCIMENTO E DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE**

Etiane Medianeira Hundertmarck Saccol

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL) N. E. BROWN
NA DIETA DO JUNDIÁ: ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA
RESPOSTA ANTIOXIDANTE**

elaborada por
Etiane Medianeira Hundertmarck Saccol

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Maria Amália Pavanato, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Bernardo Baldisserotto, Dr.
(Co-orientador)

Adalto Bianchini, Dr.
(FURG)

João Radünz Neto, Dr.
(UFSM)

Santa Maria, 06 de fevereiro de 2013.

*Aos meus pais Antonio e Rejane,
meus irmãos Mariana e Leonardo e meu noivo Nilo Junior
pelo amor incondicional, carinho, compreensão,
paciência e incentivo.*

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui, por acompanhar, abençoar e iluminar meu caminho.

A minha orientadora prof^a. Maria Amália Pavanato, pela dedicação, apoio, disponibilidade, empenho, atenção, paciência, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos e principalmente pela amizade, generosidade, confiança e exemplo de competência científica.

Ao meu co-orientador prof. Bernardo Baldisserotto pela confiança, apoio, dedicação, disponibilidade, serenidade, amizade, pelos conhecimentos recebidos, oportunidades cedidas e principalmente pelo exemplo ético de pesquisador e professor.

Ao prof. Rafael Lazzari pelo apoio, confiança, dedicação, empenho, receptividade, amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

A prof^a Berta Maria Heinzmann e prof^a Susana Llesuy pelo apoio, dedicação e conhecimentos dispensados.

Ao prof. Braulio Caron e prof^a Denise Schmidt pelo apoio e auxílio.

Ao prof. João Radünz Neto por ceder a estrutura de seu laboratório para a confecção da dieta utilizada no experimento.

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

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos colegas Ana Paula Riffel, Diogo Gabriel, Dirleise Pianesso, Érika Londero, Geisa Dolci, Giovana Ourique, Isabela Finamor, Juliano Uczay, Lenise Lima, Luciane Gressler, Patrícia Mombach, Tanise Pês e demais colegas pelo auxílio nos experimentos, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, companheirismo, amizade, dedicação e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais, Antonio e Rejane Saccol, pelo incentivo e apoio, carinho, respeito, atenção, por todo amor e dedicação dispensado a nossa família, pelo exemplo de pessoas humildes e corretas a ser seguido, pelos vários conselhos. Certamente, vocês fazem parte desta conquista.

Aos meus irmãos, Leonardo e Mariana Saccol, pelo incentivo, atenção, carinho, companheirismo, alegrias e amizade.

Ao meu noivo, Nilo Paulo de Freitas Júnior pela paciência, amor, carinho, companheirismo, amizade, alegrias, incentivo e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e carinho, em especial aos meus avôs Rosalino (*in memorian*) e Adão (*in memorian*) e minhas avós Irene (*in memorian*) e Maria Anita, pelo incentivo, amor, zelo, por entenderem minha ausência e pela eterna demonstração de carinho, mesmo que em lembranças.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

ADIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL) N. E. BROWN NA DIETA DO JUNDIÁ: ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA RESPOSTA ANTIOXIDANTE

AUTORA: Etiane Medianeira Hundertmarck Saccol

ORIENTADORA: Dr^a. Maria Amália Pavanato

CO-ORIENTADOR: Dr. Bernardo Baldisserotto

Data e local da defesa: Santa Maria, 06 de fevereiro de 2013

Com a intensificação do cultivo, os peixes se tornam mais susceptíveis ao estresse e, por consequência, ao aparecimento de doenças. Para tentar minimizar este problema, os produtores utilizam agroquímicos que, além de prejudicarem o meio ambiente, podem também prejudicar a saúde dos produtores e consumidores. O óleo essencial (EO, do inglês *essential oil*) da *Lippia alba* pode ser uma alternativa natural, pois apresenta diversos efeitos que podem reduzir as alterações fisiológicas decorrentes do estresse inerente à aquicultura. Neste estudo foi avaliada a influência de cinco dietas contendo o EO de *L. alba* (0, 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 mL de EO por kg de dieta) sobre o crescimento e a resposta antioxidante em juvenis de jundiás. Após um período de 60 dias de alimentação, os jundiás foram pesados e medidos individualmente e eutanasiados para amostragem do encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo. Os biomarcadores de estresse oxidativo, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (NPSH) foram determinados. A dieta contendo o EO de *L. alba* não influenciou o crescimento. Quanto aos biomarcadores de estresse oxidativo, o EO diminuiu a lipoperoxidação (LPO) avaliada através do TBARS e dos LOOH nas brânquias, fígado, rim e músculo do jundiá, não mostrando nenhum efeito sobre a LPO no encéfalo. A dieta com o EO aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT, GPx, GST e o conteúdo de NPSH no encéfalo; SOD, GR e GST nas brânquias; CAT, GR e o conteúdo de NPSH no fígado; CAT, GR e o conteúdo de NPSH no rim e SOD, GPx e o conteúdo de NPSH no músculo, em comparação ao grupo controle. Estes resultados indicam que o EO de *L. alba* não interfere no crescimento, diminui a LPO e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes na maioria dos tecidos avaliados, podendo ser adicionado à dieta de jundiás para aumentar a resposta antioxidante.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*. Estresse oxidativo. Defesas antioxidantes. Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduating in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

ADDITION OF *Lippia alba* (MILL) N. E. BROWN ESSENTIAL OIL TO THE SILVER CATFISH'S DIET: ANALYSIS OF GROWTH AND ANTIOXIDANT RESPONSE

AUTHOR: Etiane Medianeira Hundertmarck Saccol

ADVISER: Dr^a. Maria Amália Pavanato

CO-ADVISER: Dr. Bernardo Baldisserotto

Date and place of defense: February 06, 2013, Santa Maria.

Fish become more susceptible to stress and, consequently, to the onset of disease with the intensification of rearing. In an attempt to minimize this problem, farmers use agrochemicals that, besides harming the environment, can also affect producers and consumers' health. The essential oil (EO) of *Lippia alba* may be a natural alternative since it has several effects that can reduce the physiological changes resulting from stress inherent in aquaculture. The influence of five diets containing *L. alba* EO (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL of EO per kg of diet) on growth and antioxidant response in juvenile silver catfish was evaluated. After a feeding period of 60 days, the silver catfish were weighed and measured individually, and euthanized for sampling of brain, gill, liver, kidney and muscle. The oxidative stress biomarkers, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), lipid hydroperoxides (LOOH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and non-protein thiols groups (NPSH), were determined. Growth parameters were not affected by the diet containing *L. alba* EO. As for biomarkers of oxidative stress, lipoperoxidation (LPO) evaluated through TBARS and LOOH was reduced by the EO in the gills, liver, kidney and muscle of silver catfish; no effect was observed in the brain. The diet with the EO improved the activity of antioxidant enzymes: SOD, CAT, GPx, GST and NPSH levels in the brain; SOD, GR and GST in the gills; CAT, GR and NPSH levels in the liver; CAT, GR and NPSH levels in the kidney; and SOD, GPx and NPSH levels in the muscle. These results indicate that *L. alba* EO does not interfere with growth, decreases LPO levels and increases antioxidant enzymes activities in most tissues evaluated, and thus may be added to silver catfish diet to increase the antioxidant response.

Keywords: *Rhamdia quelen*. Oxidative stress. Antioxidant defenses. Volatile organic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplar de jundiá, <i>Rhamdia quelen</i>	14
Figura 2- Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio	17
Figura 3- Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes	19
Figura 4- Exemplar de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	23

LISTA DE TABELAS

Table 1- Formulation (%) of the experimental diet	47
Table 2- Chemical constituents of the <i>Lippia alba</i> essential oil	48
Table 3- Growth performance of the silver catfish <i>Rhamdia quelen</i> fed with diets containing different concentrations of <i>Lippia alba</i> essential oil (EO)	50
Table 4- Biomarkers of oxidative stress in tissues from the silver catfish <i>Rhamdia quelen</i> fed diets containing different concentrations of <i>Lippia alba</i> essential oil (EO)	51
Table 5- Biomarkers of oxidative stress in the kidney and muscle of <i>Rhamdia quelen</i> fed diets containing different concentrations of <i>Lippia alba</i> essential oil (EO)	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CF	Fator de condição (<i>condition factor</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EO	Óleo essencial (<i>essential oil</i>)
FCR	Taxa de conversão alimentar (<i>feed conversion ratio</i>)
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSI	Índice hepatossomático (<i>hepatosomatic index</i>)
HO [•]	Radical hidroxila
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos (<i>lipid hydroperoxide</i>)
LPO	Lipoperoxidação (<i>lipid peroxidation</i>)
MHA	Análogo hidroxilado de metionina (<i>Methionine hydroxy analogue</i>)
n-3 HUFA	Ácidos graxos altamente insaturados n-3 (<i>n-3 highly unsaturated fatty acids</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NPSH	Tióis não proteicos (<i>non-protein thiols</i>)
O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{-•}	Ânion superóxido
OS	Estresse oxidativo (<i>oxidative stress</i>)
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
RL	Radicais livres
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
RWG	Ganho de peso relativo (<i>relative weight gain</i>)
SGR	Taxa de crescimento específico (<i>specific growth rate</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
VSI	Índice viscerossomático (<i>viscerosomatic index</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 <i>Rhamdia quelen</i>	14
1.1.1 Características da espécie e os desafios em sua criação	14
1.1.2 Alternativas naturais para a produção	16
1.2 O balanço oxidativo	17
1.2.1 Espécies reativas de oxigênio	17
1.2.2 Sistema de defesa antioxidante	18
1.2.3 Plantas como antioxidantes	20
1.2.4 Estresse oxidativo	21
1.3 <i>Lippia alba</i>	23
1.3.1 Caracterização da planta	23
1.3.2 O óleo essencial	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MANUSCRITO	28
4 DISCUSSÃO GERAL	53
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

O jundiá, *Rhamdia quelen*, peixe nativo da região sul, é amplamente cultivado devido as suas características de fácil reprodução, boa resistência ao manejo e hábito alimentar onívoro, o que contribui para a aceitação de alimentos artificiais. Além disso, esta espécie apresenta boa aceitação no mercado consumidor (GOMES et al., 2000; SALHI et al., 2004; CARNEIRO; MIKOS, 2005).

Assim como os demais peixes, o jundiá em seu ambiente de cultivo encontra-se sujeito a constantes fatores inerentes a aquicultura, como manipulação, transporte, reprodução induzida, coleta de ovos e de esperma, baixa qualidade da água e alta densidade de estocagem, que levam ao estresse e que se traduzem por baixas taxas de crescimento e de eficiência alimentar (SMALL, 2003). Estes fatores também podem desencadear a situação de estresse oxidativo (OS, do inglês *oxidative stress*) e a predisposição a doenças, levando a perdas na produtividade.

Nos organismos aeróbicos, o metabolismo celular energético e o consumo de oxigênio (O₂) estão envolvidos com a geração das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Estas espécies tóxicas são intermediários reativos formados na redução parcial do O₂, e podem induzir danos em ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios, alterando a função dessas macromoléculas nas células, tecidos e órgãos (LUSHCHAK, 2011).

Diversos sistemas de proteção existem a fim de protegerem os organismos contra os efeitos deletérios provocados pelas ROS. O sistema de defesa antioxidante consiste de componentes de baixo peso molecular (glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol, etc), denominado sistema de defesa não enzimático, e das enzimas antioxidantes que compõem o sistema de defesa enzimático. Este último é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glutathione-S-transferase (GST), entre outras (BAGNYUKOVA et al., 2006).

O OS ocorre quando a produção de ROS excede a capacidade das defesas antioxidantes celulares de remover estas espécies tóxicas (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Fatores ambientais, bem como a dieta, estão associados com o OS devido ao aumento na geração das ROS ou a insuficiente detoxificação das ROS (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

Muitos produtores tentam evitar possíveis perdas em suas pisciculturas com o uso de promotores de crescimento, antibióticos e agroquímicos (SANTOS et al., 2009), que trazem malefícios a saúde do produtor, consumidores e ao meio ambiente. Em função disso, têm crescido a busca por produtos naturais, os quais possuem compostos fenólicos e terpenóides que apresentam atividade antioxidante, funcionando como sequestradores de radicais e como quelantes de metais (NICIFOROVIC et al., 2010).

A *Lippia alba*, popularmente conhecida como falsa-melissa, é um subarbusto nativo de quase todas as regiões do Brasil e possui uma ampla variedade de usos tradicionais e atividades farmacológicas. Dentre suas atividades destaca-se o uso como: analgésico, antiinflamatório, antipirético, sedativo, antiespasmódico, antimicrobiano, antiviral e no tratamento de doenças cutâneas e respiratórias (PASCUAL et al., 2001). Além destes, segundo Stashenko et al. (2004), o óleo essencial (EO, do inglês *essential oil*) de *L. alba* possui alta atividade antioxidante *in vitro*, e sob as mesmas condições, exibiu efeitos antioxidantes similares aos da vitamina E.

Assim, tendo em vista os diversos efeitos já descritos para a *L. alba*, este trabalho procurou avaliar a influência da adição de seu EO na dieta sobre o crescimento e a resposta dos biomarcadores de OS no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de juvenis de jundiá alimentados durante 60 dias. Considerando a inexistência de estudos associando a *L. alba* na dieta de peixes, este trabalho poderá contribuir com informações relevantes sobre as vantagens de um produto natural associado à piscicultura com o intuito de proporcionar benefícios à produção, meio ambiente e bem-estar dos animais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Rhamdia quelen*

1.1.1 Características da espécie e os desafios em sua criação

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Figura 1), família Heptapteridae e ordem Siluriformes, é uma espécie nativa da região Sul, presente na Bacia do Rio Uruguai distribuindo-se do sudeste do México a região central da Argentina. Possui hábito alimentar onívoro, com tendência piscívora, alimentando-se de peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (SILFVERGRIP, 1996; GOMES et al., 2000).



Figura 1- Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*.

Fonte: <http://www.fishbase.org>

É uma espécie muito resistente ao inverno e com rápido crescimento no verão, sendo importante para aquicultura de clima temperado e subtropical (BARCELLOS et al., 2004). Com corpo coberto de couro e a cor variando de marrom-avermelhado claro a cinza e a parte ventral mais clara, também pode ser encontrada em outras variações como o jundiá albino. A coloração do corpo varia de acordo com o ambiente em que se encontra, pois quando colocados em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe encontra-se em ambientes escuros (GOMES et al., 2000).

O crescimento do jundiá é mais pronunciado nos primeiros anos de vida, com uma taxa de crescimento nos machos maior que a das fêmeas, porém após o terceiro / quarto ano de vida ocorre uma inversão, a fêmea passa a crescer mais rapidamente. A maturidade sexual

é atingida após aproximadamente um ano de vida e seu período reprodutivo ocorre de agosto a março (GOMES et al., 2000).

Mesmo apresentando boa produtividade quando criado em cativeiro e uma boa aceitação no mercado consumidor, devido à sua carne saborosa e ausência de espinhos intramusculares (CARNEIRO; MIKOS, 2005), a produção do jundiá, assim como a de outras espécies, oferece alguns desafios, pois são enfrentados alguns problemas durante o cultivo e a busca por uma produção eficiente (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2005). Estes problemas vão desde o estresse provocado pelo manejo até o estabelecimento de condições propícias ao cultivo e bom desempenho no crescimento (BARCELLOS et al., 2004).

O estresse pode ser gerado por variados fatores, como altas densidades de estocagem, manejo e até mesmo uma variação brusca na temperatura da água. Condições de produção estressantes podem prejudicar o bem-estar dos peixes e isso se traduz em redução no desempenho e na saúde dos mesmos (SEGNER et al., 2012). Além disso, tais condições afetam o balanço dos pró-oxidantes/antioxidantes, desencadeando a situação de OS (MONSERRAT et al., 2007). Pelo contato íntimo entre os peixes e a água em que vivem, as condições ótimas de cultivo dependem principalmente das características químicas e físicas da água. Sendo assim, é extremamente necessário manter o controle adequado para bom um rendimento na criação (BALDISSEROTTO, 2009).

Destaca-se também que através dos alimentos disponíveis ou oferecidos os animais devem obter suficientes quantidades de nutrientes essenciais de forma a garantir a normalidade de seus processos fisiológicos e metabólicos, assegurando adequado crescimento, saúde e reprodução. Entende-se por crescimento a incorporação ou o aumento dos tecidos corporais e órgãos, acompanhado de uma alteração da conformação e forma do corpo, resultante das mudanças na taxa de aumento dos componentes corporais (CYRINO, 1995; LAZZARI, 2005).

Os fatores nutricionais, metabólicos e bioenergéticos influenciam o processo de crescimento de maneira direta, sendo a proteína o nutriente de maior importância, variando sua exigência nas diferentes espécies (MONENTCHAM et al., 2010). O baixo crescimento pode ser causado não só pela redução na ingestão alimentar, mas também pelo aumento do gasto energético solicitado por processos de desintoxicação e manutenção das funções normais do organismo (SEGNER et al., 2012).

Por isso, a associação de uma boa qualidade da água dos tanques de cultivo, manejo, densidade de estocagem e adequado teor nutricional da ração, garantirão o bem-estar dos peixes, com bons resultados no desempenho e produção. Entretanto, estas condições são

difícilmente controladas e, muitas vezes, os criadores lançam mão de promotores do crescimento, uso de antibióticos e agroquímicos para evitar possíveis perdas (SANTOS et al., 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), antibióticos promotores de crescimento são “agentes antibióticos utilizados com o propósito de aumentar o ganho de peso diário ou a eficiência alimentar (taxa de ganho de peso em razão da alimentação) em animais produtores de alimentos”. Em termos de produtividade animal, a adição de promotores do crescimento à alimentação é uma prática comum para elevar a produtividade ou aumentar a conversão alimentar, embora não sejam substâncias nutritivas. A ação destes antibióticos e antimicrobianos quimioterápicos como promotores de crescimento se baseia, principalmente, na redução da atividade de microrganismos antagonistas no intestino, permitindo uma maior eficiência na absorção de nutrientes pelo animal, resultando em 4-6,5% de aumento no ganho de peso e utilização do alimento (CORRÊA et al., 2002).

Em contrapartida, estudos mostram que antibióticos no meio ambiente têm contribuído no desenvolvimento de bactérias resistentes, entre outros efeitos (BILA; DEZOTTI, 2003). A resistência bacteriana ocorre quando as bactérias desenvolvem um mecanismo de adaptação / sobrevivência ao uso do promotor de crescimento, este fato é de forma geral associado ao uso de doses subterapêuticas de forma continuada e por longos períodos de tempo. O uso de agroquímicos, como os pesticidas, também deve ser evitado, devido principalmente à ocorrência de contaminação ambiental e à indução de OS provocada por certos pesticidas que podem inativar enzimas, levando a uma diminuição do potencial antioxidante, dentre outros mecanismos (LUSHCHAK, 2011).

1.1.2 Alternativas naturais para a produção

A crescente demanda por alimentos mais saudáveis, sem resíduos de antibióticos e agroquímicos (SANTOS et al., 2009) e, até mesmo, a redução do efeito poluidor dos mananciais, tem sugerido vias alternativas para produção e estimulação do crescimento na piscicultura. Assim, estratégias profiláticas focadas na nutrição têm sido testadas para otimizar o desempenho, melhorar a saúde e a eficiência nutricional para animais.

Dentre essas estratégias, destaca-se o uso de produtos naturais na dieta que atuem como promotores do crescimento, melhorando o desempenho e a saúde do animal, devido à

ação de controle de patógenos pela atividade antimicrobiana, à atividade antioxidante, à melhora na digestão por meio do estímulo da atividade enzimática e da absorção de nitrogênio, além de outros efeitos (OETTING et al. 2006; SANTOS et al., 2009).

Em um estudo com *O. niloticus*, o alho (*Alium sativum*) em pó adicionado na dieta aumentou o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar (DIAB et al., 2002). Do mesmo modo, a adição do EO de orégano (*Origanum heracleoticum*) na dieta de *Ictalurus punctatus* promoveu o crescimento, melhorou a capacidade antioxidante e a resistência a doenças por patógenos (ZHENG et al., 2009).

1.2 O balanço oxidativo

1.2.1 Espécies reativas de oxigênio

A respiração celular e o conseqüente consumo de O_2 oferecem vantagem metabólica aos organismos aeróbicos, por meio da oxidação de combustíveis moleculares, como glicose e ácidos graxos, produzindo a molécula energética ATP. Entretanto, o metabolismo do O_2 também gera uma série de subprodutos reativos que podem produzir efeitos tóxicos à célula (OHARA, 2006). Através de reduções parciais do O_2 são formados intermediários reativos (Figura 2) como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2), denominados espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*).

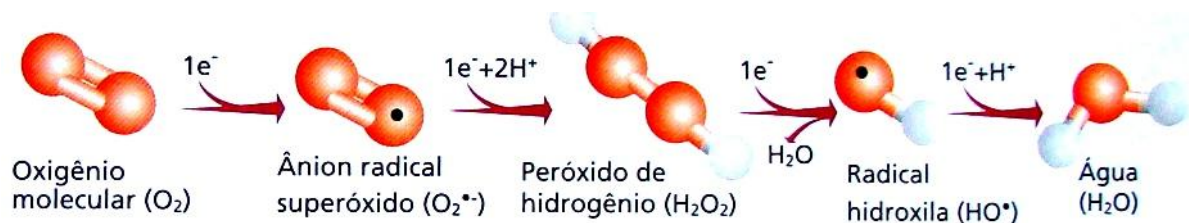


Figura 2- Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio.

Fonte: OHARA (2006).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos, derivados do metabolismo normal da célula, sendo consideradas as mitocôndrias como a maior fonte *in vivo* dessas espécies (CHANCE et al., 1979). A maioria das ROS são radicais livres (RL), definidos como sendo qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, característica que lhe confere alta reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os RL são formados pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, por meio de reações “redox” ou de óxido-redução.

Altas concentrações de ROS, denominadas pró-oxidantes, devem ser evitadas pelo organismo, uma vez que a reatividade destas espécies traz consequências celulares deletérias, como a oxidação de lipídios, proteínas e DNA, prejudicando a função fisiológica (SIES, 1991). Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação das ROS, uma vez que estas levam à oxidação dos fosfolipídios, conhecida como lipoperoxidação (LPO), que diminuiu a fluidez e altera a estrutura e a função normal das biomembranas. Através da LPO são formados hidroperóxidos lipídicos que decompõem ligações duplas de ácidos graxos, destruindo a membrana lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A formação de grupos carbonil, que se correlacionam diretamente com danos causados às proteínas, também pode ocorrer pelo aumento de ROS que atuam sobre grupos amino das proteínas, alterando sua estrutura e função (ALMROTH et al., 2005). Este processo é irreversível e causa alterações conformacionais, diminuição da atividade catalítica de enzimas e, finalmente, resulta em degradação de proteínas por proteases, devido a maior suscetibilidade (ALMROTH et al., 2005). A formação da proteína carbonil também pode se dar através de mecanismos secundários, como resultado de reações dos RL com outros constituintes celulares como lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os ácidos nucleicos também sofrem ataque das ROS e, por consequência, ocorre dano no DNA, alterando a função destas macromoléculas nas células, tecidos e órgãos, ocasionando mutações, apoptose e o rompimento da homeostase celular (JIANG et al., 2010).

1.2.2 Sistema de defesa antioxidante

A fim de atenuar as consequências da toxicidade causada pelo O₂, os organismos aeróbicos desenvolveram o sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são a principal

linha de defesa e correspondem a quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou mesmo impedem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O processo de defesa atua na prevenção, eliminação das ROS formadas e no reparo de moléculas modificadas pelas ROS (SIES, 1997). Este processo é realizado por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

O mecanismo antioxidante enzimático envolve as enzimas que fazem a proteção primária e intrínseca do organismo (Figura 3), como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), entre outras. Através da ação destas enzimas, evita-se o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 e a formação das demais ROS no organismo, mantendo a concentração das ROS dentro dos limites fisiológicos (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

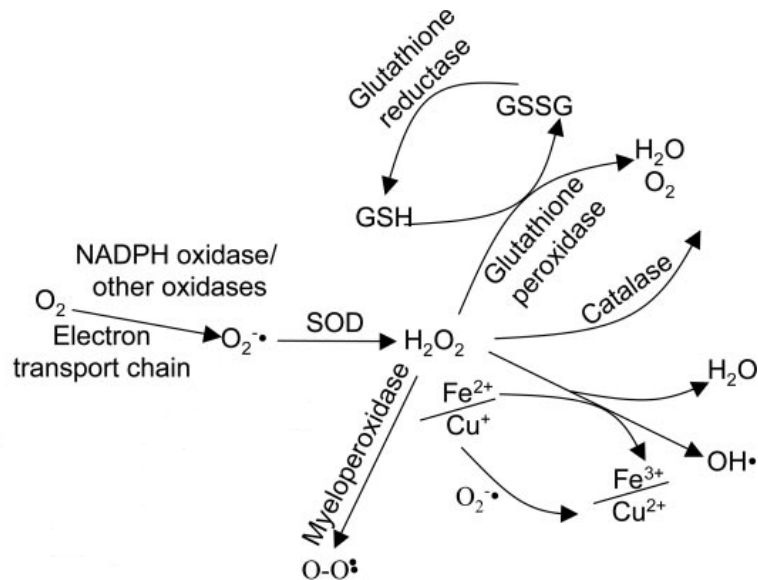


Figura 3- Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Vincent et al., 2004.

A SOD, importante defesa antioxidante, está presente tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD) e participa da reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 . A CAT, encontrada principalmente nos peroxissomos, promove a degradação do H_2O_2 em O_2 e água e, desta forma, diminui o risco da formação de HO^{\bullet} , um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos, uma vez que pode atravessar membranas celulares e reagir com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GPx catalisa a redução dos peróxidos inorgânicos e orgânicos, que são efetivos formadores de ROS, com a oxidação de um doador de hidrogênio. Utiliza a glutathione reduzida (GSH) como co-fator, formando a glutathione oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, é reduzida pela ação da enzima GR, utilizando o NADPH como doador de elétron (SIES, 1997). A GST catalisa reações de conjugação entre GSH e moléculas oxidadas. Atua na remoção dos xenobióticos e produtos de LPO, transformando o composto tóxico em uma forma facilmente excretável (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

O sistema de defesa não enzimático corresponde a moléculas que protegem os alvos biológicos da oxidação, sendo moléculas do próprio organismo, exógenas, sintéticas ou naturais. Esse sistema vai atuar na supressão da formação, eliminação ou desativação das ROS (SIES, 1991). Dentre as principais defesas não enzimáticas estão as moléculas lipossolúveis, como o α -tocoferol e os carotenóides, e moléculas hidrossolúveis, como o tripeptídeo glutathione (GSH) e o ácido ascórbico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O α -tocoferol confere proteção à membrana celular por agir como um quelante dos oxidantes produzidos durante a LPO. Já o ácido ascórbico, por ser hidrofílico, pode neutralizar diretamente as ROS, devido a sua propriedade de doador de elétron (RIBEIRO et al., 2005). O GSH é considerado o principal antioxidante intracelular, por que está presente em todas as formas de vida e é rapidamente oxidado em condições nas quais ocorre um aumento na produção celular de ROS. Sua capacidade antioxidante é devida ao grupo sulfidrila do aminoácido cisteína, que se oxida facilmente, atuando como um redutor celular (OHARA, 2006).

1.2.3 Plantas como antioxidantes

O uso de plantas e ervas aromáticas como antioxidantes em alimentos processados está se tornando cada vez mais importante na indústria de alimentos, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (MADSEN; BERTELSEN, 1995). Essa alternativa se estabelece devido às plantas sintetizarem compostos antioxidantes, como produtos secundários, que são principalmente compostos fenólicos e terpenóides, servindo como mecanismos de defesa para neutralizar as ROS, a fim de evitar o dano oxidativo (BAKKALI et al., 2008).

Muitos compostos fenólicos oriundos de plantas apresentam-se como antioxidantes mais poderosos que as vitaminas E e C (VINSON et al., 1995; SHIKANGA et al., 2010). A

atividade antioxidante dos compostos fenólicos e terpenóides está relacionada a diferentes mecanismos, tais como a eliminação das ROS, doação de hidrogênio, supressão do $^1\text{O}_2$, quelação de íons metálicos e atuação como um substrato para os radicais, tais como $\text{O}_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} (NICIFOROVIC et al., 2010).

1.2.4 Estresse oxidativo

A célula, unidade da vida, é uma verdadeira usina de pró e antioxidantes. Quando há um desequilíbrio entre a concentração das ROS e a geração do sistema de defesa antioxidante, com predomínio dos pró-oxidantes, o quadro é reconhecido como OS, podendo levar a injúrias e até mesmo a morte celular (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005; PAVANATO; LLESUY, 2008). O OS é resultado de um dos três fatores: (1) aumento na geração das ROS, através da acumulação de intermediários reativos; (2) prejuízo do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos); (3) incapacidade para reparar o dano oxidativo (ALY et al., 2010). Estudos têm demonstrado que qualquer forte estresse geralmente é acompanhado pelo estabelecimento da situação de OS (LUSHCHAK, 2011).

Nos peixes existem várias situações que induzem ao OS (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005), podendo afetar a produtividade dos viveiros e a aquicultura. Dentre os organismos aeróbicos, os peixes são muito suscetíveis ao ataque das ROS, principalmente porque seus tecidos são caracterizados por uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) (LIN; SHIAU, 2007). Os PUFAS podem ser atacados pelas ROS, levando à perda da função celular, sendo por isso, muito significativas as medidas de LPO em peixes (STOREY, 1996).

Para se protegerem dos danos das ROS, estes organismos possuem defesas antioxidantes, assim como os demais seres aeróbicos, porém, em níveis menores do que em pássaros e mamíferos (WILHELM FILHO, 2007). Além disso, as defesas antioxidantes nos peixes dependem de vários fatores, como idade, comportamento alimentar, fatores nutricionais, fatores ambientais, infestações por parasitas, entre outros (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005).

Dentre estes fatores, o controle de uma dieta com as quantidades ideais de nutrientes é essencial para o crescimento e a manutenção das funções vitais dos peixes, como respostas a

estressores e defesas imunológicas. Diversos estudos têm relacionado os níveis de vitaminas e aminoácidos na dieta de peixes com o *status* oxidativo nestes organismos.

Em *Oncorhynchus mykiss* a suplementação com vitamina E (0, 100 ou 1000 mg de acetato de α -tocoferol/kg de dieta) protegeu contra o OS causado por altos níveis de ácidos graxos altamente insaturados n-3 (n-3 HUFA, do inglês *n-3 highly unsaturated fatty acids*) (20% ou 40% n-3 HUFA) na dieta. Os resultados mostraram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, correspondendo a um mecanismo fisiológico que combate a elevação dos RL sob situações de OS (PUANGKAEW et al., 2005). A dieta contendo vitaminas C e E (100 mg de ácido ascórbico e α -tocoferol) também foi eficiente na proteção contra o OS causado por exposição ao cobre (4,0; 2,5 e 1 mg/L) em *Terapon jarbua*, sendo verificada uma diminuição na LPO em todos os tecidos avaliados (VIJAYAVEL et al., 2006).

Os níveis de LPO no soro e músculo de *Cyprinus carpio* var. Jian alimentados por 60 dias com dieta contendo altos níveis de um análogo hidroxilado de metionina (MHA, do inglês *methionine hydroxy analogue*) (0; 5,1; 7,6; 10,2; 12,7 e 15,3 g de MHA/kg da dieta) também diminuiu, enquanto que a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GR e GST mostrou-se maior, indicando que o MHA aumenta o *status* antioxidante e deprime a oxidação de lipídios (XIAO et al., 2012). Em outro estudo com *C. carpio* no qual foi verificada a influência da dieta contendo altos níveis de histidina (2,3- controle; 4,4; 6,3; 8,6; 10,8 e 12,7 g de histidina/kg de dieta) sobre a resposta antioxidante, os resultados também mostraram uma redução nos níveis de LPO e um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, GST e no conteúdo de GSH (FENG et al., 2012).

Em resumo, estes estudos demonstraram que a adição de substâncias com propriedades antioxidantes, como vitaminas ou aminoácidos, na dieta de peixes pode aumentar a capacidade de eliminação das ROS, inibindo a oxidação de lipídios, e estimular a atividade das enzimas antioxidantes e o conteúdo dos antioxidantes não enzimáticos, contribuindo para o aumento da resposta antioxidante nestes organismos (PUANGKAEW et al., 2005; FENG et al., 2012; XIAO et al., 2012).

1.3 *Lippia alba*

1.3.1 Caracterização da planta

A planta em estudo (Figura 4) é representante do gênero *Lippia*, o qual pertence à família Verbenaceae e inclui aproximadamente 200 espécies de ervas e arbustos. Este gênero tem uma ampla distribuição desde países da América Central e América do Sul, na África Tropical (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al., 2001), e até mesmo, presente na Índia (SINGH et al., 2000) e Austrália (DAY; Mc ANDREW, 2003).



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

Adaptado de: HENNEBELLE et al., 2008.

Lippia alba é um subarbusto de morfologia variável, com aproximadamente 1,5 metros de altura, sendo nativa de quase todas as regiões do Brasil. Cresce em solos arenosos, nas margens de rios, lagos e lagoas. Apresenta um crescimento rápido, estando presente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CORRÊA, 1992).

Possui ramos finos, esbranquiçados, longos e quebradiços e folhas inteiras, opostas, de bordos serrados, com uma fina pilosidade e ápice agudo. Suas flores são reunidas em inflorescências axilares capituliformes azul-roxeadas, de tamanho variável e os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas. Em função do meio em que se encontra, esta espécie

está sujeita a grandes variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas (CORRÊA, 1992; GOMES et al., 1993).

Os nomes locais e tradicionais dessa planta são numerosos na América Latina, em razão de seus variados usos tradicionais, bem como de seu odor aromático ou propriedades medicinais (HENNEBELLE et al., 2008). Aqui no Brasil, esta espécie é popularmente conhecida pelos nomes de falsa-melissa, erva-cidreira, carmelitana, lípia, cidreira, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-do-brasil, cidreira-brava e pronto-alívio, dentre tantos outros.

Como já mencionado, a *L. alba* possui uma ampla variedade de usos tradicionais e atividades farmacológicas. Estes efeitos são: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sedativo, usado no tratamento de doenças cutâneas, remédio para doenças gastrointestinais, tratamento de doenças hepáticas, antimicrobiano, antiviral, antiespasmódico, tratamento de doenças respiratórias, cistostático e anticonvulsivante, além de ser usado como tempero culinário.

1.3.2 O óleo essencial

Os EOs são compostos voláteis, naturais e complexos, caracterizados pelo odor forte e formados por metabólitos secundários nas plantas aromáticas (CORRÊA, 1992). Há uma ampla variedade de métodos para sua extração, prensagem ou expressão, a extração com solventes orgânicos ou gorduras, a extração por fluido supercrítico e a destilação por arraste de vapor d'água. Este último método é o mais utilizado, uma vez que apresenta bons rendimentos, fácil execução e baixo custo (HENNEBELLE et al., 2008).

Apresentam de 20 a 60 componentes em mistura, sendo um, dois, ou três deles majoritários em termos de porcentagem. Os terpenóides e seus derivados de baixo peso molecular são os constituintes predominantes dos EOs (PASCUAL et al., 2001). Tais compostos representam uma ampla classe de substâncias formadas pela condensação de diferentes unidades de isopreno (C_5H_{10}). Os terpenóides mais frequentes nos EOs são os monoterpenóides e os sesquiterpenóides (BAKKALI et al., 2008).

Através de estudos histoquímicos é possível identificar na *L. alba* a presença de EOs em todo o mesofilo, nos pelos glandulares e nas células oclusivas dos estômatos (CORRÊA, 1992). As diversas propriedades descritas para a *L. alba* estão associadas aos constituintes ativos presentes no seu EO: monoterpenos (linalol, limoneno, geranial, entre outros),

sesquiterpenos (β -cariofileno, α -muuruleno, óxido de cariofileno, entre outros) e compostos fenólicos (flavonóides e feniletanóides) (PASCUAL et al., 2001).

Entretanto, a composição do EO apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando a separação em quimiotipos, os quais poderiam apresentar atividades farmacológicas distintas, além de diferenças morfológicas e anatômicas (TELES et al., 2012). Os quimiotipos foram separados por seus elementos predominantes: 1,8-cineol (ZOGHBI et al., 1998), carvona (MATOS, 1996), diidrocarvona (FESTER et al., 1961), g-terpineno (GOMES et al., 1993), limoneno (ZOGHBI et al., 1998), citral (ZOGHBI et al., 1998; FUN; SVENDENSEN, 1990; MATOS et al., 1996), cânfora (DELACASSA et al., 1990), d,l-limoneno, piperitona (FESTER et al., 1954), β -cariofileno (CRAVEIRO et al., 1981) e linalol (FRIGHETTO et al., 1998).

Diversos trabalhos tratam da caracterização química destes quimiotipos e já foi demonstrado que citral, mirceno e limoneno são os prováveis responsáveis pela maioria dos efeitos centrais dos quimiotipos do EO de *L. alba* (VALE et al., 2002). Potentes efeitos anticonvulsivante, sedativo, miorelaxante em ratos e atividade antimicrobiana já foram verificados para o seu EO (VIANA et al., 2000).

Além disso, o EO da *L. alba* mostrou-se efetivo na indução da sedação (5-20 mg/L) e anestesia (100-500 mg/L) e inibiu o estresse em *R. quelen*, sem causar alteração no sabor e no odor do filé (CUNHA et al., 2010). Outro efeito importante do EO de *L. alba* já descrito é a atividade antioxidante, demonstrada em um estudo *in vitro* pelo método de oxidação do ácido linoleico induzido por íons Fe^{+2} (STASHENKO et al., 2004), o que torna esta planta aromática uma fonte promissora de antioxidantes naturais.

Dentre os constituintes encontrados no EO de *L. alba* cultivada na região sul do Brasil, o componente principal é o linalol (HELDWEIN et al., 2012). O linalol é um composto monoterpênico considerado como o principal componente dos EOs em várias espécies de plantas aromáticas. Para este componente, já foi verificada atividade antioxidante semelhante a da vitamina E e do ácido lipoico, em um estudo em que a administração intraperitoneal desses compostos reduziu o OS induzido por H_2O_2 em cérebro de porquinho-da-índia (ÇELIK; ÖZKAYA, 2002).

Para o jundiá, a adição do EO de *L. alba* em sacos para transporte, foi capaz de melhorar o estado redox, uma vez que a presença do EO reduziu a LPO no tecido hepático e branquial, demonstrando ser um bom antioxidante (AZAMBUJA et al., 2011).

Considerando a busca pelo estabelecimento do bem-estar animal, a importância da substituição de produtos sintéticos por produtos naturais no cultivo de animais e aos vários

efeitos já descritos para o EO de *L. alba*, este estudo mostra-se de ampla relevância. Além disso, estudos relativos à *L. alba* na dieta de peixes e os biomarcadores de OS são inexistentes. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos exercidos pela adição de diferentes concentrações do EO de *L. alba* na dieta sobre o crescimento e os biomarcadores de OS em juvenis de *R. quelen*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da dieta contendo diferentes concentrações do EO de *L. alba* sobre o crescimento e os biomarcadores de OS em juvenis de jundiás (*R. quelen*).

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da dieta contendo o EO de *L. alba* sobre o crescimento de jundiás através da análise dos parâmetros zootécnicos (RWG, SGR, FCR, HSI, VSI, CF).
- Determinar os níveis de LPO através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações do EO de *L. alba*;
- Analisar as alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR e GST em encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo, ocasionadas pela alimentação dos jundiás com dietas contendo diferentes concentrações do EO de *L. alba*;
- Avaliar o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (medida indireta de GSH) em encéfalo, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações do EO de *L. alba*.

3 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as especificações requisitadas pela revista AQUACULTURE, ao qual foi submetido para publicação.

**Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the silver catfish's diet:
analysis of growth and antioxidant response**

Etiane M. H. Saccol^a, Juliano Uczay^d, Tanise S. Pês^a, Isabela A. Finamor^a, Giovana M. Ourique^a, Ana P. K. Riffel^e, Denise Schmidt^c, Braulio O. Caron^c, Berta M. Heinzmann^b, Susana F. Llesuy^f, Rafael Lazzari^d, Bernardo Baldisserotto^a, Maria A. Pavanato^{a*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil.

^bDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil.

^cDepartment of Agricultural and Environmental Sciences, Federal University of Santa Maria, Campus Frederico Westphalen, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul 98400-000, Brazil.

^dDepartment of Animal Science and Biology, Federal University of Santa Maria, Campus Palmeira das Missões, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul 98300-000, Brazil.

^eDepartment of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil.

^fDepartment of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires 1113, Argentina.

*Corresponding author: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, 1000, Roraima Avenue, Camobi 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220 9381

E-mail adress: amaliapavanato@yahoo.com.br (M. A. Pavanato).

Abstract

The growth and oxidative stress biomarkers effects of adding *L. alba* essential oil (EO) to the diet (0- control, 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 mL EO per kg diet) in juvenile silver catfish were investigated for 60 days. A diet containing the EO did not exert any influence on the growth of these animals. However, it reduced lipid peroxidation (LPO), measured by thiobarbituric acid reactive substances and lipid hydroperoxides, in their gills, liver, kidney and muscle, showing no effect on LPO in the brain. In turn, the diet with the EO increased the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) and the content of non-protein thiols (NPSH) in the brain; SOD, glutathione reductase (GR) and GST in gills; CAT, GR and NPSH levels in liver; CAT, GR and NPSH content in the kidney; and SOD, GPx and NPSH content in muscle, compared to the control group. Thus, in spite of not improving growth, the addition of *L. alba* EO to the diet of silver catfish is recommended because it decreases LPO and increases antioxidant response in the tissues.

Keywords: *Rhamdia quelen*, oxidative stress, antioxidant defenses, volatile organic compounds.

1. Introduction

The development of a sustainable aquaculture depends on the maintenance of suitable conditions for maximizing growth and fish welfare. Stressful cultivation conditions such as a high stocking density, nutritional imbalance and/or poor water quality impair fish welfare, which translates into a reduction in fish performance and health and can lead to oxidative stress (Gao et al., 2012). Oxidative stress occurs due to either the overproduction of reactive oxygen species (ROS) or decreases in cellular antioxidant levels and can lead to oxidative damage, protein oxidation and DNA damage (Halliwell and Gutteridge, 1999), such as lipid peroxidation (LPO), which is particularly important for aquatic animals because their tissues are characterized by larger amounts of highly unsaturated fatty acids than other species (Huang et al., 2003).

However, under a normal physiological state, ROS generated in tissues and subcellular compartments are efficiently scavenged by the antioxidant defense system. This system is composed of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT),

glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST), and non-enzymatic antioxidants, such as reduced glutathione (GSH) (Azambuja et al., 2011). Both types of antioxidants, enzymatic and non-enzymatic, can be used as biomarkers of oxidative stress (Lushchak and Bagnyukova, 2006).

Antioxidant compounds can also be synthesized by plants as secondary products to act as part of defense mechanisms to counteract ROS to avoid oxidative damage (Niciforovic et al., 2010). Recent studies have demonstrated that the addition of natural antioxidants from plants to the diets of fish can enhance performance and antioxidant activity (Zheng et al., 2009).

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown, known as “false-melissa” in Brazil, is an aromatic shrub that belongs to the Verbenaceae family and is widespread throughout Central and South America, Africa and southern United States of America. Many traditional uses and pharmacological activities have been described for this plant (Hennebelle et al., 2008), including antioxidant activity (Stashenko et al., 2004). Many of its reported health benefits and bioactive properties are directly related to the composition of its essential oil (EO). However, significant variations are observed in this composition, suggesting the existence of chemotypes (Hennebelle et al., 2008). In Brazil, three main chemotypes are reported and are classified according to their major constituents, such as citral, carvone and linalool (Heldwein et al., 2012).

Currently, studies linking the effects of *L. alba* EO and fish are scarce. Cunha et al. (2010) found that *L. alba* EO is effective in inducing sedation and anesthesia and that it acts as an inhibitor of stress in the silver catfish *Rhamdia quelen*. In addition, Azambuja et al. (2011) demonstrated that the use of *L. alba* EO improves the redox state and survival during the transport of this species. The cellular energy metabolism and oxygen consumption are coupled to the generation of ROS, therefore, a reduction in metabolic rate reduces the formation of ROS (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). In general, the anesthetic substances have inhibitory effects on the respiratory system of fishes, resulting in a slower respiratory rate, and consequently a situation of sustained hypoxia (Gressler et al., 2012). This situation activates the antioxidant defense system in order to compensate the oxidative stress caused by increased generation of ROS that occurs during reoxygenation of tissue, mechanism known as "preparation for oxidative stress" (Buzadzic et al., 1990). Therefore, considering the search for the establishment of animal welfare, the importance of using natural products in growing animals and the effects already described for the *L. alba*, this

study aimed to investigate the effects of adding *L. alba* EO to the diet of silver catfish on growth and biomarkers of oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Fish and culture conditions

The experiments were conducted in a recirculating aquaculture system in the Aquaculture Laboratory at the Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Silver catfish (22.93 ± 0.75 g, 13.82 ± 0.12 cm) were obtained from a local producer and acclimated to the laboratory conditions for two weeks. After this period, the fish were randomly distributed into fifteen polypropylene tanks (250 L), 20 fish per tank. Water parameters were checked daily (temperature, total ammonia, nitrite and dissolved oxygen) or weekly (alkalinity, total hardness and pH). The experimental protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation of UFSM under registration n° 46/2010.

2.2. Essential oil extraction and analysis

L. alba was cultivated in Frederico Westphalen, RS, Brazil. The plant material was identified by botanist Dr. Gilberto Dolejal Zanetti (Department of Industrial Pharmacy, UFSM). A voucher specimen (SMDB n° 10050) was deposited in the herbarium of the Department of Biology (UFSM).

The EO was obtained from fresh plant leaves by hydrodistillation for 2 h using a Clevenger type apparatus (European Pharmacopeia, 2007) and was stored at -20°C until composition and performance analyses. The composition of the EO was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS TIC analysis was performed using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to an Agilent 5973 mass selective detector under the following conditions: HP-5 MS column (5% phenyl-95% methylsiloxane, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$); EI-MS: 70 eV; operating conditions: split inlet, 1:100; temperature program, $40\text{-}260^{\circ}\text{C}$; 40°C for 4 min; ramp rate, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$; carrier gas, He; flow rate, 1 mL/min; injector and detector temperature, 220°C ; interface temperature, 250°C . The constituents of the EO were identified by comparing the mass spectra with a mass spectral

library (NIST, 2002) and by comparing the Kovats retention index with data from the literature (Adams, 2001).

2.3. Diets and experimental design

Five diets were formulated (36.16% crude protein and 8.24% crude lipid) based on the study of Lazzari et al. (2008). All ingredients were finely ground, weighed and mixed by kneading until homogeneous. Different concentrations of the *L. alba* EO (0-control, 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 mL EO per kg of diet) were added to the mixture together with canola oil (Table 1). Water was then added to the diets, and a drying process was performed in a forced air circulation oven for 24 h (35°C). Finally, the pellets were broken, sieved and stored in a freezer until use. The fish received the experimental diets until apparent satiation twice a day (9 h and 17 h) for 60 days. The experimental design resulted in five groups (performed in triplicate).

2.4. Sample collection and analytical methods

2.4.1. Growth performance detection

The fish were weighed and measured on days 0 and 60 of the experiment; however, the biomass of each replicate was determined weekly to adjust the food supply. Growth performance was calculated as follows:

Relative weight gain (RWG %) = $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial body weight}$;

Specific growth rate (SGR % per day) = $100 \times (\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / \text{days of the experiment}$;

Feed conversion ratio (FCR) = $\text{feed consumed (g)} / \text{weight gain (g)}$;

Hepatosomatic index (HSI %) = $100 \times (\text{liver weight, g}) / (\text{whole body weight, g})$;

Viscerosomatic index (VSI %) = $100 \times (\text{visceral weight, g}) / (\text{whole body weight, g})$;

Condition factor (CF) = $100 \times (\text{body weight, g}) / (\text{body length, cm})^3$

2.4.2. Oxidative stress biomarkers

After 60 days, 10 fish were randomly selected per treatment and killed by sectioning the spinal cord. Brain, gills, liver, kidney and muscle were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissues were stored at -70°C for further measurements. Each tissue was homogenized as described by Azambuja et al. (2011).

Protein content was measured using the method of Lowry et al. (1951) and bovine serum albumin as a standard. The results are reported as mg/mL. LPO was estimated using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay (Buege and Aust, 1978). The results are reported as nmol/mg protein. LPO was also measured by determining lipid hydroperoxides (LOOH) using of the method of Södergren et al. (1998). The readings were performed using a spectrophotometer at 560 nm and the results are reported as nmol/mg protein.

Total SOD activity, expressed as SOD units/mg protein, was based on the inhibition rate of autocatalytic adenochrome generation at 480 nm (Misra and Fridovich, 1972). CAT activity was evaluated by following the decrease in the 240 nm absorption of hydrogen peroxide (H₂O₂) and is typically reported as μ mol/mg protein (Boveris and Chance, 1973). GPx activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm, as described by Flohé and Gunzler (1984), and the results are expressed as nmol/min/mg protein. GR activity is expressed as nmol/min/mg protein at 340 nm, as described by Carlberg and Mannervik (1985). GST activity, expressed as μ mol/min/mg protein, was measured by following the rate of dinitrophenyl-S-glutathione formation at 340 nm (Habig et al., 1974).

Non-protein thiols (NPSH) content, an indirect measure of GSH, were evaluated at 412 nm after reacting with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Proteins were eliminated through the addition of 0.5 M perchloric acid (Ellman, 1959). NPSH content is reported in μ mol/mg protein.

2.5. Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error (S.E.). The Levene's test was performed to evaluate the homogeneity of variances of the data. The data exhibited homogeneous variances. Therefore, comparisons between different treatments were made using a one-way analysis of variance followed by Dunnet's test with Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. EO composition

The major components of the EO were linalool (55.26%), 1,8-cineole (7.85%), γ -muurolene (4.63%), β -cariophyllene (3.15%) and *E*-carveol (2.79%) (Table 2).

3.2. Water quality parameters

The water parameters remained stable throughout the experimental period. The temperature was maintained at $21.50 \pm 0.28^\circ\text{C}$, pH at 7.41 ± 0.03 and dissolved oxygen at 5.74 ± 0.10 mg/L. The mean of other parameters were: hardness (71.77 ± 1.63 mg/L CaCO_3), alkalinity (50.17 ± 0.72 mg/L CaCO_3), nitrite (0.31 ± 0.02 mg/L), total ammonia (1.66 ± 0.08 mg/L) and non-ionized ammonia (0.019 ± 0.001 mg/L).

3.3. Growth performance

No mortality occurred throughout the experiment. Moreover, no significant differences were observed in the growth rates and other zootechnical parameters of the silver catfish fed with diets containing *L. alba* EO when compared to the control group (Table 3).

3.4. Biomarkers of oxidative stress in the brain

Protein content did not differ from the control group. The LPO levels determined using TBARS and LOOH showed no significant differences in the silver catfish fed with diets containing *L. alba* EO when compared to the control. The SOD activity was 45%, 36% and 35% higher in the fish fed with 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, than in the control. CAT activity was also higher in the silver catfish fed with 0.5 (52%), 1.0 (48%) and 2.0 (67%) mL EO per kg of diet than in the control group. The GPx activities were 84% and 98% higher in the animals fed with 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, when compared to the control. The GST activity was higher in the silver catfish fed with 0.25 (36%), 0.5 (54%), 1.0 (44%) and 2.0 (44%) mL EO per kg of diet than in the control. The NPSH content was higher in the fish fed with 0.25 (39%), 0.5 (46%), 1.0 (45%) and 2.0 (55%) mL EO per kg of diet than in the control. In contrast, the GR activity showed no significant difference in the brain of the silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO when compared to that of the control group (Table 4).

3.5. Biomarkers of oxidative stress in gills

Protein content did not differ from the control group. The LPO levels measured using TBARS were lower in the silver catfish fed with 0.25 (18%), 0.5 (20%), 1.0 (15%) and 2.0 (23%) mL EO per kg of diet than in the control. The LPO levels determined using LOOH were also lower in the fish fed with 0.25 (13%), 0.5 (12%), 1.0 (19%) and 2.0 (13%) mL EO per kg of diet than in the control. The SOD activities were 37%, 58%, 36% and 38% higher in the animals fed with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, when compared to the control. GR activity was 65% higher only in the fish fed with 2.0 mL EO per kg of diet when compared to the control. The GST activity was higher in the fish fed with 0.5 (27%), 1.0 (28%) and 2.0 (28%) mL EO per kg of diet when compared to the control. In contrast, the CAT and GPx activities exhibited no significant differences in the silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO when compared to the control group (Table 4).

3.6. Biomarkers of oxidative stress in liver

Protein content did not differ from the control group. The LPO levels determined using TBARS were lower in the fish fed with 0.5 (27%), 1.0 (20%) and 2.0 (23%) mL EO per kg of diet than in the control, which was also true when using the LOOH measurements, i.e., 31%, 33%, 37% and 35% lower in the silver catfish fed with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, when compared to the control. The CAT activity was higher in the animals fed with 0.25 (38%), 0.5 (28%), 1.0 (29%) and 2.0 (26%) mL EO per kg of diet when compared to the control. The GR activity was 94% higher only in the animals fed with 2.0 mL EO per kg of diet when compared to the control group. The NPSH content was higher in the silver catfish fed with 0.25 (33%), 0.5 (32%), 1.0 (31%) and 2.0 (32%) mL EO per kg of diet than in the control. In contrast, the SOD, GPx and GST activities showed no significant differences in the silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO when compared to the control group (Table 4).

3.7. Biomarkers of oxidative stress in kidney

Protein content did not differ from the control group. The LPO levels measured using TBARS were lower in the animals fed with 0.5 (37%), 1.0 (54%) and 2.0 (51%) mL EO per kg of diet than in the control. The LPO levels determined using LOOH were also lower in the

fish fed with 0.25 (14%), 0.5 (14%), 1.0 (18%) and 2.0 (14%) mL EO per kg of diet than in the control. The CAT activity was 37% higher only in the silver catfish fed with 1.0 mL EO per kg of diet when compared to the control. The GR activity was higher in the animals fed with 1.0 (120%) and 2.0 (130%) mL EO per kg of diet than in the control. The NPSH content was higher in the fish fed with 0.5 (37%), 1.0 (60%) and 2.0 (62%) mL EO per kg of diet than in the control. In contrast, the GPx and GST activities exhibited no significant differences in the silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO when compared to the control group (Table 5).

3.8. Biomarkers of oxidative stress in muscle

Protein content did not differ from the control group. The LPO levels determined using TBARS in the muscle were lower in the fish fed with 0.25 (35%), 0.5 (35%), 1.0 (33%) and 2.0 (33%) mL EO per kg of diet than in the control, which was also true for the LOOH measurements, i.e., 14%, 16%, 14% and 16% lower in the silver catfish fed with 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, when compared to the control. SOD activity was higher in the animals fed with 0.25 (14%), 0.5 (18%) and 2.0 (15%) mL EO per kg of diet when compared to the control. The GPx activities were 47% and 52% higher in the fish fed with 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet, respectively, when compared to the control. The NPSH content was 17% higher only in the silver catfish fed with 2.0 mL EO per kg of diet when compared to the control. In contrast, the GR and GST activities exhibited no significant differences in the silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO when compared to the control (Table 5).

4. Discussion

4.1. Differences in tissue antioxidant response

Tissues and organs have different rates of metabolic activity and oxygen consumption and their levels of antioxidants are also different. The activity and expression of antioxidant enzymes may be organ specific, but they could also be modulated by the metabolic requirements of the tissue, thus each organ contains its own antioxidant capacity (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Maranesi et al. (2004) confirmed that protection against LPO differs from tissue to tissue, and in some the defense mechanism appears to be less efficient.

In the present study, it was observed a clear difference in the antioxidant response of each tissue (Tables 4 and 5). The level of TBARS in control fish were highest in kidney, intermediate in brain, gills and muscle, and lowest in liver, being that gills and muscle were similar. The levels of LOOH were also tissue-specific, the highest concentration in control tissues was found in kidney and the lowest was in liver, similar to TBARS, but with intermediate values in gills, muscle and brain.

Although each enzyme plays a specific function, its action can be partially substituted by the actions of other antioxidants (Bagnyukova et al., 2005) including enzyme activities or the levels of low molecular weight antioxidants. The differences in the tissues may be due to different rates of free radical generation, differences in susceptibility to oxidative damage or different antioxidant capacities of the tissues (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009).

The activity of SOD in control fish was highest in liver and progressively lower in brain, muscle and gills. CAT activity in control fish was highest in liver, intermediate in kidney and very low in gills and brain. GPx activity in control tissues was highest in liver and decreasing in the order gills > kidney > brain > muscle. SOD, CAT and GPx were similarly elevated in liver, indicating a coordinated up-regulation of the three principal antioxidant enzymes, just as was seen in the study of Lushchak et al. (2005).

GR activity in control tissues was similar in brain, muscle and gills but lower in kidney and liver. The activity of GST was much higher in the kidney in control fish, with activity similar to gills and liver and lower activity in muscle and brain. The NPSH content was relatively similar for the different tissues, with the highest concentration in kidney and lower in muscle.

4.2. Growth performance and antioxidant response in diet with *L. alba* EO

The addition of any concentration of *L. alba* EO to a diet did not significantly interfere with silver catfish growth. Thus, this EO can be included in fish feed. In addition, a diet supplemented with carotenoids did not affect the growth of characins (*Hyphessobrycon callistus*) after eight weeks of rearing (Wang et al., 2006).

Recent studies have demonstrated that the addition of antioxidants to the diet of a fish of commercial interest can significantly increase productivity and improve fish health (Dabrowski et al., 2004; Gao et al., 2012). Zheng et al. (2009) demonstrated that when added to the diet of *Ictalurus punctatus*, oregano (*Origanum heracleoticum* L.) EO acts as a growth promoter and increases antioxidant activity and the fish's resistance to *Aeromonas*

hydrophila. In accord with the findings of that study, the results of this study demonstrate that the addition of *L. alba* EO to the diet of the silver catfish is an important tool to enhance the antioxidant status of this species.

The antioxidant activities of most EOs have been attributed to the presence of phenolic compounds, which act as radical scavengers and, sometimes, as metal chelators; however, some non-phenolic substances may also display considerable antioxidant potential (Franz et al., 2010). The data from the present study indicate that only constituents of terpenic origin are found in the *L. alba* EO, with linalool being the main component. This component can prevent the brain LPO induced by H₂O₂ in guinea pig, displaying antioxidant properties similar to lipoic acid and vitamin E (Çelik and Özkaya, 2002). Moreover, Stashenko et al. (2004) state that the *in vitro* antioxidant activity of *L. alba* EO is similar to those of vitamin E and butylated hydroxyanisole.

The addition of *L. alba* EO to the silver catfish's diet did not alter its LPO levels in the brain, although this tissue is particularly vulnerable to oxidative damage due to its high oxygen consumption, high content of polyunsaturated fatty acids, and the presence of transition metals as Fe and Cu, which can lead to ROS formation via the Fenton reaction (Mieiro et al, 2011). In accordance, Azambuja et al. (2011) report that the addition of 10 µL/L of *L. alba* EO to the water did not affect the LPO levels in the brain of silver catfish transported for 6 h.

SOD and CAT exhibited higher activities, in the brain of silver catfish fed with 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet compared to the control. SOD is a key antioxidant enzyme in the metabolism of ROS, removes superoxide (O₂^{•-}) and prevents the formation of other ROS. A decrease in O₂^{•-} due to SOD activity elevates H₂O₂ production, which is removed by CAT (Lushchak and Bagnyukova, 2006).

GPx activity was also higher in the brain of fish fed with 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet than those fed with the control diet. GPx catalyzes the conversion of both H₂O₂ and organic hydroperoxides to less reactive products, employing GSH in its reduced form as an electron donor. Oxidized glutathione is also reduced by the action of GR with NADPH as an electron donor (Elia et al., 2006).

GST activity was higher in the brain of silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO than those fed with the control diet. GST has a major role in the detoxification of xenobiotics and ROS through their conjugation to GSH, thus favoring protection against LPO (Yang et al., 2001). These findings are in accord with those of Kütter et al., (2012), who found no changes in the LPO levels associated with increased GST

activities in the brains of *Trachinotus marginatus* fed with a diet containing different concentrations of α -lipoic acid for 42 days. Moreover, the NPSH content was also higher in the brains of silver catfish fed with any of the diets supplemented with *L. alba* EO than those fed with the control diet. GSH, an important non-enzymatic antioxidant, plays a central role in second line antioxidant defenses, can reduce ROS and is a substrate for GPx and GST activities (Elia et al., 2006).

In gills the addition of *L. alba* EO to the diet of the silver catfish resulted in lower LPO levels and higher SOD, GR (only 2.0 mL EO per kg of diet) and GST (0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet) activities. Azambuja et al. (2011) demonstrated that the addition of *L. alba* EO to their water also resulted in decreased LPO levels in the gills of silver catfish transported for 7 h. Vijayavel et al. (2006) reported that LPO levels were reduced and SOD activity was increased in the gills of *Terapon jarbua* subjected to stress induced by copper (1.0 mg/ L) and treated with diets containing 100 mg of ascorbic acid and α -tocopherol for 14 days.

The liver is the main site of various key metabolic pathways and the most frequently studied tissue with regard to oxidative stress. The addition of *L. alba* EO to the diet of silver catfish led to lower LPO levels and a higher CAT activity, GR activity (only 2.0 mL EO per kg of diet) and NPSH content in the silver catfish tissue. These data are in agreement with those reported by Vijayavel et al. (2006). Tocher et al. (2002) also demonstrated increases in CAT and GR activities in the liver of *Hippoglossus hippoglossus* and *Sparus aurata*, respectively, fed a diet supplemented with 100 mg/kg of vitamin E. Moreover, both species showed decreased levels of hepatic LPO when fed this diet.

The kidney has also a role *in vivo* detoxification of xenobiotics and the addition of *L. alba* EO to the diet of the silver catfish resulted in lower LPO levels and a higher CAT (only 1.0 mL EO per kg of diet) and GR activities (1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet). Pacini et al. (2012) reported that *Tinca tinca* fed for eight weeks with a diet supplemented with selenium (1.0 mg/kg), which plays an important antioxidant role as a GPx cofactor, had an increased level of CAT activity and a decreased level of GR activity in the kidney of this species. The NPSH content was higher in the kidney of silver catfish fed with 0.5, 1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet than those fed with the control diet. Similar results were obtained by Elia et al. (2011), who observed that a diet supplemented with selenium (1.0 mg/kg) led to an increase in the GSH content in the renal tissue of *Cyprinus carpio* that were fed this diet for 60 days.

The muscle has a low content of mitochondria and a low intensity oxidative metabolism, which explains the lower activity of antioxidant enzymes in the muscle of silver

catfish compared to other tissues. The addition of *L. alba* EO to the silver catfish diet resulted in lower LPO levels, higher SOD (0.25, 0.5 and 2.0 mL EO per kg of diet) and GPx (1.0 and 2.0 mL EO per kg of diet) activities and a higher NPSH content (only 2.0 mL EO per kg of diet) in muscle. Similar results were obtained by Jiang et al. (2010), who observed that juvenile *Cyprinus carpio* var. Jian fed with a graded level of myo-inositol for 60 days displayed reductions in LPO and protein carbonyl levels in muscle tissue that are typically associated with increased activities for the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx and GST. Those data are in agreement with those reported by Vijayavel et al. (2006). These response profiles, which are reported in the literature, are similar to those found in the present study.

Furthermore, it should be emphasized that Cunha et al. (2010) described that *L. alba* EO acts as an inhibitor of stress and induces sedation (5 to 20 mg/L) and anesthesia (100 to 500 mg/L), causing no change in odor and taste in silver catfish fillets. Thus, besides the antioxidant effect, probably by the action of its major compound (linalool), the diet containing *L. alba* EO may also have exerted sedative effect. The increase of antioxidant enzymes and NPSH content in the tissues of fish fed with diet containing *L. alba* EO fits well with the theory of "preparation for oxidative stress" (Buzadzic et al., 1990; Hermes-Lima, Zenteno-Savín, 2002). Possibly the diet containing *L. alba* EO induced a certain degree of sedation and, consequently, caused a reduction in metabolism and oxygen consumption. Thus the generation of ROS was also reduced, justifying the lower levels of LPO found in most tissues analyzed for silver catfish fed diets containing EO.

Studies with low oxygen availability also induced elevation of antioxidant enzymes in *Carassius auratus* (Lushchak et al., 2001) and *Cyprinus carpio* (Lushchak et al., 2005). Enhancement of antioxidant defenses during physiological states where the oxygen free radical production should be reduced is considered as an evolutionary adaptation and a preparatory mechanism that minimizes potential damage due to oxidative stress during reoxygenation when oxygen consumption increases.

5 Conclusions

The addition of *L. alba* EO to the diet of silver catfish does not influence growth. Moreover, it appears to be a good antioxidant because this EO prevented the LPO and increased the antioxidant status of the evaluated tissues, probably due to the action of linalool. Furthermore, the addition of the lowest concentration of *L. alba* EO (0.25 mL/kg) to the diet was beneficial as resulted in increased antioxidant responses. The diet containing *L. alba* EO

may also have led to sedation and decreased metabolism, increasing the antioxidant responses, mechanism that explained the theory of adaptation. However, more research is needed to confirm the mechanism of action of *L. alba* EO in the diet of silver catfish.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX) and Ministry of Fisheries and Aquaculture/Ministry of Science and Technology/ FINEP.

References

- Adams, R. P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. (3rd ed.). Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Azambuja, C. R., Mattiazzi, J., Riffel, A. P. K., Finamor, I. A., Garcia, L. O., Heldwein, C. G., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Llesuy, S. F., 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319, 156-161.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2005. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 142, 335-341.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134, 707-716.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302-310.
- Buzadzic, B., Spasic, M., Saicic, Z. S., Radojicic, R., Petrovic, V. M., Haliwell, B., 1990. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radical Biology and Medicine* 9, 407-413.
- Carlberg, I., Mannervick, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113, 484-499.

- Çelik, S., Özkaya, A., 2002. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35, 547-552.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B., 2010. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 306, 403-406.
- Dabrowski, K., Lee, K., Guz, L., Verlhac, V., & Gabaudan, J., 2004. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 233, 383-392.
- Elia, A. C., Anastasi, V., Dörr, A. J. M., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid for superficial water potabilization. *Chemosphere* 64, 1633-1641.
- Elia, A. C., Prearo, M., Pacini, N., Dörr, A. J. M., Abete, M. C., 2011. Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 166-173.
- Ellman, J., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.
- European Pharmacopoeia, 2007. (6th ed.). Strassbourg: European Directorate for the Quality of Medicines.
- Flohé, L., Gunzler, W. A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. In S. P. Colowick, & O. N. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology* (pp. 114-121). San Diego: Academic Press.
- Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W., 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 327-340.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R. E. P., Han, Y., 2012. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 356-357, 73-79.

- Gressler, L. T., Riffel, A. P. K., Parodi, T. V., Saccol, E. M. H., Koakoski, G., Costa, S. T., Pavanato, M. A., Heinzmann, B. M., Caron, B., Schmidt, D., Llesuy, S. F., Barcellos, L. J. G., Baldisserotto, B., 2012. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*, 1–12.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M .C., 1999. Free radicals in biology and medicine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31, 1454-1468.
- Heldwein, C. G., Silva, L. L., Reckziegel, P., Barros, F. M. C., Bürger, M. E., Baldisserotto, B., Mallmann, C. A., Schmidt, D., Caron, B. O., Heinzmann, B. M., 2012. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45, 436-443.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 211-222.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 133, 537-556.
- Huang, C. H., Chang, R. J., Huang, S. L., Chen, W. L., 2003. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O-aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 134, 265-270.
- Jiang, W. D., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Li, S. H., Zhou, X. Q., 2010. Lipid peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle, intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of myo-inositol. *Food Chemistry* 120, 692-697.
- Kütter, M. T., Monserrat, J. M., Primel, E. G., Caldas, S. S., Tesser, M. B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture* 368-369, 29-35.

- Lazzari, R., Radünz Neto, J., Pedron, F. A., Veiverberg, C. A., Bergamin, G. T., Lima, R. L., Emanuelli, T., Steffens, C., 2008. Performance and fillet composition of jundiá (*Rhamdia quelen*) submitted to different diets in the rearing. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine* 60, 477- 484.
- Limón-Pacheco, J. L., Gonsebatt, M. E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674, 137-147.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farra, L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 144, 283-289.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., Storey, K. B. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 1319-1330.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology* 280, R100-R107.
- Maranesi, M., Bochicchio, D., Zambonin, L., Tolomelli, B., Cabrini, L., 2004. Effects of different dietary amounts of LCPUFA n3 and vitamin B6 on lipid composition and antioxidant defences in rat kidney. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15, 396-401.
- Mieiro, C. L., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Pacheco, M., 2011. Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*)- Bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquatic Toxicology* 103, 233-240.
- Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic, S., Stojkovic, A., Pavlovic Muratspahic, D., 2010. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3125-3130.
- NIST/EPA/NIH mass spectral library and search/analysis programs, 2002. Hoboken: J. Wiley and Sons.

- Pacini, N., Abete, M. C., Dörr, A. J. M., Prearo, M., Natali, M., Elia, A. C., 2012. Detoxifying response in juvenile tench fed by selenium diet. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33, 46-52.
- Södergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L, Vessby B., 1998. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 7, 137-146.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martínez, J. R., 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography Part A* 1025, 93-103.
- Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y., 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* 8, 195-207.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Balasubramanian, M. P., 2006. Dietary ascorbic acid and α -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. *Science of the Total Environment* 372, 157-163.
- Wang, Y., Chien, Y., Pan, C., 2006. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture* 261, 641-648.
- Yang, Y., Cheng, J. Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi S., 2001. Role of glutathione S-transferase in protection against lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 19220-19230.
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., Wang, K. Y., 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant, effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 292, 214-218.

Table 1- Formulation (%) of the experimental diet.

Ingredients	(%)
Soybean meal	30
Meat and bone meal	35
Rice bran	12
Corn	15
Canola oil	3
Salt	1
Vitamins and minerals (premix) ^a	3
Phosphate dicalcium	1

^aVitamin 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: 2,000 mg, iron: 820 mg, iodo: 100 mg, manganese: 3,750 mg, niacin: 5,000 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1,000,000 UI, vitamin B1: 1,250 mg, vitamin B12: 3,750 mcg, vitamin B2: 2,500 mg, vitamin B6: 2,485 mg, vitamin C: 2,8000 mg, vitamin D3: 500,000 UI, vitamin E: 20,000 UI, vitamin K: 500 mg, zinc: 17,500 mg.

Table 2- Chemical constituents of the *Lippia alba* essential oil.

Components	Relative %	Retention time (min)	IK ^a	IK	Reference
			calculated	literature	
α -Thujene	0.05	9.509	927	925	NIST
α -Pinene	0.11	9.717	932	939	Adams
Camphene	0.09	10.277	946	954	Adams
Sabinene	1.30	11.355	972	975	Adams
β -Pinene	0.11	11.394	973	976	NIST
1-Octen-3-ol	0.42	11.747	982	979	Adams
6-Methyl-5-hepten-2-one	0.10	12.063	989	986	Adams
β -Myrcene	0.40	12.173	992	991	Adams
Limonene	0.22	13.622	1027	1029	Adams
1,8-Cineole	7.85	13.736	1030	1031	Adams
Z- β -Ocimene	0.08	14.121	1040	1037	Adams
E- β -Ocimene	0.73	14.522	1049	1050	Adams
γ -Terpinene	0.05	14.883	1058	1060	Adams
Bicyclo [3.1.0] hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-(1 α , 2 β , 5 α)	0.19	15.242	1067	-	NIST
2- Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro- α , α , 5-Trimethyl-E	0.11	15.5	1073	1081	NIST
Terpinolene	0.07	16.07	1087	1089	Adams
Z-Linalool oxide	0.09	16.176	1090	1087	Adams
E-Sabinene hydrate	0.04	16.537	1098	1098	Adams
Linalool	55.26	16.99	1110	1097	Adams
Hotrienol	0.25	17.021	1111	1104	Adams
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E	0.16	17.505	1123	1134	NIST
α -Campholenal	0.04	17.669	1127	1127	NIST
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E	0.30	17.81	1131	1134	NIST
E-pinocarveol	0.06	18.097	1138	1138	NIST
Camphor	0.96	18.287	1143	1146	NIST
2-Pinen-4-ol	0.19	18.333	1144	1142	NIST
Pinocarvone	0.16	19.005	1162	1165	Adams
Borneol	0.15	19.13	1165	1169	Adams
Terpinen-4-ol	0.12	19.592	1177	1177	Adams
α -Terpineol	0.36	20.118	1190	1189	Adams
Myrtenal	0.10	20.31	1195	1196	Adams
E-carveol	2.79	20.894	1211	1214	NIST
Nerol	0.22	21.585	1229	1230	Adams
Neral (citral b)	0.69	22.035	1242	1238	Adams
Geraniol	0.17	22.56	1256	1253	Adams

Geranial (citral a)	0.88	23.128	1271	1267	Adams
Exo-2-hydroxycineole acetate	0.21	25.673	1343	1342	NIST
Neryl acetate	0.08	26.463	1366	1362	Adams
α -Copaene	0.23	26.802	1376	1377	Adams
β -Bourbonene	0.41	27.12	1385	1388	NIST
β -Caryophyllene	3.15	28.295	1420	1419	Adams
β -Copaene	0.18	28.607	1430	1432	Adams
γ -Elemene	0.49	28.776	1435	1437	Adams
α -Caryophyllene	0.49	29.412	1455	1455	Adams
E- β -Farnesene	0.52	29.532	1458	1458	NIST
Allo-aromadendrene	0.22	29.658	1462	1460	Adams
γ -Muurolene	4.63	30.345	1483	1480	Adams
α -Muurolene	0.27	30.948	1502	1500	Adams
Germacrene A	0.57	31.078	1506	1509	Adams
γ -Cadinene	0.90	31.42	1517	1514	Adams
δ -Cadinene	0.32	31.67	1525	1523	Adams
Germacrene B	2.56	32.724	1559	1561	Adams
E-Nerolidol	0.56	32.906	1565	1563	Adams
Caryophyllene oxide	1.57	33.534	1586	1583	Adams
Calarene epoxide	0.22	34.34	1613	-	NIST
1,10-Di-epi-cubenol	0.14	34.488	1618	1619	Adams
1-epi-cubenol	0.17	34.882	1631	1629	Adams
τ -Muurolol	0.21	35.292	1645	1642	NIST
α -Cadinol	0.32	35.642	1657	1654	NIST
Total identified	93.28				

^aIK = Kovats retention index. Adams, 2001. NIST Databank, 2002.

Table 3- Growth performance of the silver catfish *Rhamdia quelen* fed with diets containing different concentrations of *Lippia alba* essential oil (EO).

	Diet (mL EO per kg diet)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Final W ^a	56.26 ± 0.39	49.55 ± 1.24	49.84 ± 0.70	48.02 ± 0.32	49.77 ± 0.95
RWG ^b	144.53 ± 10.31	98.96 ± 5.25	122.51 ± 2.48	132.72 ± 3.26	123.95 ± 0.22
SGR ^c	1.44 ± 0.07	1.12 ± 0.05	1.33 ± 0.02	1.40 ± 0.02	1.34 ± 0.02
FCR ^d	2.52 ± 0.14	3.50 ± 0.21	2.63 ± 0.05	2.40 ± 0.04	2.50 ± 0.01
HSI ^e	1.04 ± 0.05	1.05 ± 0.08	1.14 ± 0.08	1.11 ± 0.07	1.03 ± 0.07
VSI ^f	5.64 ± 0.27	5.43 ± 0.33	5.18 ± 0.21	5.03 ± 0.22	4.73 ± 0.29
CF ^g	0.94 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.94 ± 0.01	1.00 ± 0.01

^aFinal W- final weight (g), ^bRWG- relative weight gain (%), ^cSGR- specific growth rate (% per day), ^dFCR- feed conversion ratio, ^eHSI- hepatosomatic index (%), ^fVSI- viscerosomatic index (%), ^gCF- condition factor. Values are expressed as the mean ± SE (n=20). Means obtained showed no significant difference (p>0.05).

Table 4- Biomarkers of oxidative stress in tissues from the silver catfish *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of *Lippia alba* essential oil (EO).

	Diet (mL EO per kg diet)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Brain					
PROTEIN ^a	5.62 ± 0.29	4.56 ± 0.45	4.49 ± 0.27	4.83 ± 0.54	4.63 ± 0.20
TBARS ^b	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.51 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.51 ± 0.03
LOOH ^c	15.51 ± 0.83	14.88 ± 0.78	14.27 ± 0.62	15.28 ± 0.85	15.16 ± 0.88
SOD ^d	2.34 ± 0.15	2.48 ± 0.11	3.39 ± 0.15*	3.18 ± 0.25*	3.17 ± 0.21*
CAT ^e	0.27 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.04*	0.40 ± 0.05*	0.45 ± 0.02*
GPx ^f	12.04 ± 2.39	20.55 ± 1.35	19.68 ± 0.39	22.05 ± 3.32*	23.85 ± 2.79*
GR ^g	4.77 ± 1.27	4.67 ± 3.02	4.83 ± 2.39	7.86 ± 2.87	8.75 ± 2.65
GST ^h	21.10 ± 1.36	28.79 ± 2.44*	32.44 ± 2.23*	30.44 ± 2.00*	30.47 ± 1.60*
NPSH ⁱ	11.93 ± 0.66	16.56 ± 1.13*	17.42 ± 0.98*	17.34 ± 1.64*	18.55 ± 0.77*
Gills					
PROTEIN ^a	7.86 ± 0.23	8.15 ± 0.31	8.90 ± 0.33	8.64 ± 0.33	8.57 ± 0.44
TBARS ^b	0.40 ± 0.02	0.33 ± 0.02*	0.32 ± 0.01*	0.34 ± 0.01*	0.31 ± 0.01*
LOOH ^c	22.40 ± 0.47	19.54 ± 0.66*	19.66 ± 0.59*	18.20 ± 0.81*	19.50 ± 0.73*
SOD ^d	0.98 ± 0.09	1.34 ± 0.12*	1.55 ± 0.11*	1.33 ± 0.06*	1.35 ± 0.10*
CAT ^e	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.03
GPx ^f	20.43 ± 2.05	20.71 ± 2.06	21.11 ± 2.25	20.32 ± 2.10	21.84 ± 2.47
GR ^g	4.03 ± 0.30	6.00 ± 1.15	5.87 ± 1.29	5.20 ± 0.50	6.55 ± 0.69*
GST ^h	30.64 ± 1.97	33.67 ± 2.93	38.99 ± 1.70*	39.28 ± 1.44*	39.11 ± 1.71*
Liver					
PROTEIN ^a	11.00 ± 0.42	10.78 ± 0.23	11.36 ± 0.53	10.80 ± 0.58	11.96 ± 0.50
TBARS ^b	0.30 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.22 ± 0.01*	0.24 ± 0.01*	0.23 ± 0.01*
LOOH ^c	12.36 ± 0.55	8.52 ± 0.40*	8.31 ± 0.37*	7.83 ± 0.36*	7.98 ± 0.29*
SOD ^d	2.51 ± 0.10	2.66 ± 0.11	2.84 ± 0.17	2.81 ± 0.18	2.75 ± 0.22
CAT ^e	4.97 ± 0.19	6.88 ± 0.19*	6.34 ± 0.39*	6.42 ± 0.45*	6.24 ± 0.37*
GPx ^f	38.22 ± 9.98	42.88 ± 11.33	54.51 ± 18.52	57.51 ± 12.61	65.29 ± 4.87
GR ^g	1.68 ± 0.24	2.33 ± 0.28	2.37 ± 0.44	2.53 ± 0.59	3.27 ± 0.39*
GST ^h	28.80 ± 1.32	24.31 ± 0.87	31.67 ± 2.34	29.80 ± 1.42	25.29 ± 1.62
NPSH ⁱ	9.02 ± 0.56	12.00 ± 0.53*	11.93 ± 0.66*	11.80 ± 0.87*	11.94 ± 0.84*

^aPROTEIN- protein content (mg/mL), ^bTBARS- thiobarbituric acid reactive substances (nmol/mg protein), ^cLOOH- lipid hydroperoxide (nmol/mg protein), ^dSOD- superoxide dismutase (SOD units/mg protein), ^eCAT- catalase (µmol/mg protein), ^fGPx- glutathione peroxidase (nmol/min/mg protein), ^gGR- glutathione reductase (nmol/min/mg protein), ^hGST- glutathione-S-transferase (µmol/min/mg protein), ⁱNPSH- non-protein thiols (µmol/mg protein). Values are reported as the mean ± SE (n=10). *Significantly different from the control group (p<0.05).

Table 5- Biomarkers of oxidative stress in the kidney and muscle of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of *Lippia alba* essential oil (EO).

	Diet (mL EO per kg diet)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
Kidney					
PROTEIN ^a	7.84 ± 0.48	7.13 ± 0.46	7.03 ± 0.30	6.44 ± 0.43	8.01 ± 0.45
TBARS ^b	3.06 ± 0.28	2.70 ± 0.25	1.92 ± 0.15*	1.40 ± 0.14*	1.51 ± 0.10*
LOOH ^c	29.43 ± 0.44	25.42 ± 1.13*	25.23 ± 0.71*	24.19 ± 1.28*	25.42 ± 0.77*
CAT ^e	2.19 ± 0.06	2.67 ± 0.18	2.62 ± 0.22	3.01 ± 0.22*	2.43 ± 0.17
GPx ^f	13.83 ± 2.78	19.00 ± 4.23	22.63 ± 2.26	24.13 ± 3.93	23.18 ± 2.26
GR ^g	1.97 ± 0.48	2.50 ± 0.60	2.75 ± 0.51	4.36 ± 0.25*	4.59 ± 0.42*
GST ^h	112.46 ± 9.03	133.20 ± 14.79	130.77 ± 8.01	149.74 ± 18.21	143.01 ± 10.46
NPSH ⁱ	13.62 ± 1.28	13.88 ± 0.58	18.65 ± 1.11*	21.77 ± 1.08*	22.03 ± 1.25*
Muscle					
PROTEIN ^a	8.22 ± 0.21	9.10 ± 0.29	7.83 ± 0.45	8.44 ± 0.11	8.60 ± 0.14
TBARS ^b	0.40 ± 0.04	0.26 ± 0.03*	0.26 ± 0.02*	0.27 ± 0.02*	0.27 ± 0.02*
LOOH ^c	21.58 ± 0.61	18.66 ± 0.20*	18.14 ± 0.33*	18.51 ± 0.39*	18.09 ± 0.32*
SOD ^d	1.77 ± 0.04	2.02 ± 0.06*	2.09 ± 0.02*	1.90 ± 0.06	2.03 ± 0.04*
GPx ^f	6.20 ± 1.12	6.48 ± 0.69	8.87 ± 0.79	9.08 ± 0.67*	9.44 ± 0.65*
GR ^g	4.29 ± 0.53	5.08 ± 0.19	4.72 ± 0.94	5.60 ± 0.68	5.39 ± 0.45
GST ^h	27.76 ± 1.65	28.04 ± 1.13	30.55 ± 1.09	31.57 ± 1.54	32.41 ± 1.04
NPSH ⁱ	8.93 ± 0.41	8.75 ± 0.37	9.87 ± 0.20	9.39 ± 0.17	10.47 ± 0.23*

^aPROTEIN- protein content (mg/mL), ^bTBARS- thiobarbituric acid reactive substances (nmol/mg protein), ^cLOOH- lipid hydroperoxide (nmol/mg protein), ^dSOD- superoxide dismutase (SOD units/mg protein), ^eCAT- catalase (pmol/mg protein), ^fGPx- glutathione peroxidase (nmol/min/mg protein), ^gGR- glutathione reductase (nmol/min/mg protein), ^hGST- glutathione-S-transferase (μmol/min/mg protein), ⁱNPSH- non-protein thiols (μmol/mg protein). Values are reported as the mean ± SE (n=10). *Significantly different from the control group (p<0.05).

4 DISCUSSÃO GERAL

O crescimento observado em nosso estudo foi relativamente bom, uma vez que o peso dos animais mais que dobrou depois dos 60 dias experimentais. Além disso, os valores observados para SGR foram semelhantes aos valores obtidos no estudo de Lazzari et al. (2008) (2.1 ± 0.1 % por dia), onde foi utilizada a mesma formulação da dieta (farinha de ossos e carne + farelo de soja), porém durante 90 dias de alimentação.

No entanto, não houve diferença significativa na adição do EO de *L. alba* em relação ao grupo controle. É importante destacar que os exemplares de jundiá apresentaram visualmente excelente estado durante todo o período experimental. As condições experimentais foram as mesmas para todos os tratamentos e não houve nenhum desafio sanitário ou ambiental que pudesse potencializar os efeitos que EO de *L. alba* poderia causar. Assim, a adição do EO de *L. alba* na dieta do jundiá não provocou efeito positivo sobre o crescimento e nas demais variáveis analisadas, uma vez que as condições eram ideais para o bom desempenho dos animais. Sugere-se que sejam feitos estudos inserindo algum desafio, como por exemplo, a infecção com *Aeromonas hydrophila*, e então, verificados os efeitos da dieta com o EO de *L. alba* frente a este estressor.

Estudos com antioxidantes já bem conhecidos, como a vitamina E, adicionados à dieta de peixes, mostram resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, com aumento do *status* antioxidante, servindo como uma proteção ao OE. Este aumento na resposta antioxidante provocado pela adição do EO de *L. alba* pode ser devido à presença do composto linalol, visto que este já demonstrou alta atividade antioxidante (ÇELIK; ÖZKAYA, 2002). Além disso, já foi comprovado que o EO de *L. alba* apresenta efeito sedativo e anestésico (CUNHA et al., 2010). Assim, possivelmente a dieta contendo o EO induziu certo grau de sedação e, por consequência, levou a uma redução no metabolismo e no consumo de O₂. Esta redução no metabolismo gera uma diminuição na formação das ROS e um aumento na atividade das enzimas antioxidantes como uma adaptação para a prevenção do OS ocasionado no momento de uma futura reoxigenação, teoria esta denominada de “preparação para o estresse oxidativo” (BUZADZIC et al., 1990; HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

Entretanto, outros estudos devem ser realizados para verificar se este efeito antioxidante é devido somente à presença do composto majoritário, o linalol, ou se é resultante do efeito sinérgico dos componentes do óleo, além de analisarem a forma de

atuação do EO de *L. alba* sobre o mecanismo adaptativo de aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a proteção da LPO.

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, a adição do EO na dieta de peixes é recomendada. O EO de *L. alba* tem um rendimento estimado de 0,1- 1,0% (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996) e o método para a sua extração é de baixo custo, o que torna possível seu uso em dietas para a piscicultura.

Entretanto, maiores avaliações precisam ser realizadas, visto que o EO de *L. alba* possui um potencial grande a ser explorado devido a seus vários efeitos já descritos. A avaliação de outros biomarcadores como dados imunológicos podem vir a concluir sobre as vantagens concretas do EO na produção, no meio ambiente e ao estabelecimento do bem-estar dos peixes.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, podemos concluir que a adição do EO de *L. alba* nas concentrações testadas na dieta do jundiá não altera o crescimento e influencia benéficamente os biomarcadores de OS, podendo ser adicionada à dieta do jundiá.

Mesmo a menor concentração testada de adição do EO (0.25 mL) na dieta do jundiá foi capaz de reduzir a LPO, medida através de TBARS e dos LOOH, na maioria dos tecidos avaliados. Além disso, a adição do EO de *L. alba* na dieta dos jundiás aumentou a atividade das enzimas antioxidantes em seus tecidos.

O conteúdo de NPSH também foi maior nos tecidos de jundiás alimentados com a dieta contendo o EO, sugerindo que a adição do EO de *L. alba* na dieta aumenta a resposta antioxidante nos tecidos dos jundiás. O aumento observado pode ser tanto em função do efeito antioxidante do EO, provavelmente por ação do linalol, como também explicado pela teoria da adaptação, uma vez que a dieta contendo o EO de *L. alba* pode ter levado a sedação e redução do metabolismo, aumentando a resposta antioxidante. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o mecanismo de ação do EO de *L. alba* na dieta para os jundiás.

REFERÊNCIAS

- ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 171-180, 2005.
- ALY, N. et al. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 7-12, 2010.
- AZAMBUJA, C. R. et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. **Aquaculture**, v. 319, p. 156-161, 2011.
- BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 325-331, 2006.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia* sp.) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 303-325, 2005.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Nursery rearing of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, p. 383-394, 2004.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.523-530, 2003.
- BUZADZIC, B. et al. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 407-413, 1990.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n.1, p.187-191, 2005.

ÇELIK, S.; ÖZKAYA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 547-552. 2002.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-601, 1979.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & Wilson-erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, n. 3, p. 57-64, 1992.

CORRÊA, G. S. S. et al. Utilização de antibióticos e probióticos como promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 75-81, 2002.

CRAVEIRO, A. et al. Essential oils from brasilian Verbenaceae Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 598-601, 1981.

CUNHA, M. A. et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

CYRINO, J.E.P. Regulação nutricional do crescimento em peixes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS. **CBNA- Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Anais**. Campos do Jordão. 126 p., p.69-90, 1995.

DAY, M. D.; Mc ANDREW, T. D. The biology and host range of *Falconia intermedia* (Hemiptera: Miridae), a potential biological control agent for *Lantana camara* (Verbenaceae) in Australia. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, p. 13-22, 2003.

DELACASSA, E. et al. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguai. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, p. 107-108, 1990.

DIAB, A. S.; EL-NAGAR, G. O.; ABD-EL-HADY, Y. M. Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. **Suez Canal Veterinary Medicinal Journal**, p. 745-75. 2002.

FENG, et al. Effects of dietary histidine on antioxidant capacity in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish Physiology Biochemistry**, DOI 10.1007/s10695-012-9719-9, 2012.

FESTER, G. et al. La esencia de *Lippia alba* de Isla Puente (y de Villa Ana). **Revista de La Facultad de Ingenieria Química**, p. 5-10, 1961.

FESTER, G. A.; MARTINUZI, E. A.; RICCIARDI, A. I. **Anales de La Asociacion Quimica Argentina**, v. 42, p. 43, 1954.

FRIGHETTO, N. et al. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, p. 578-580, 1998.

FUN, C. E; SVENDENSEN, A. B. The essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, p. 265-267, 1990.

GOMES, E. C. et al. Constituents of the essential oil from *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 29-32, 1993.

GOMES, L. C. et al. Biología do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 436-443, 2012.

HENNEBELLE, T, et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 133, p. 537-556, 2002.

JIANG, W. D. et al. Lipid peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle, intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of myo-inositol. **Food Chemistry**, v. 120, p. 692-697, 2010.

LAZZARI, R. **Estudo de enzimas digestivas, crescimento e composição centesimal de filés de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com diferentes fontes protéicas.** Santa Maria, 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

LAZZARI, R. et al. Desempenho e composição dos filés de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes dietas na fase de recria. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 60, p. 477-484, 2008.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LIN, Y.-H.; SHIAU, S.-Y. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. **Aquaculture**, v. 267, p. 38-43, 2007.

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

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

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 271-277, 1995.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. M.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p.75-88, 2005.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos do Nordeste do Brasil- chemical analysis of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae). Parte II- Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, p. 137-141, 1996.

MATOS, F. J. A. et al. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 695-698, 1996.

MONENTCHAM, S. -E.; POUOMOGNE, V.; KESTEMONT, P. Influence of dietary protein levels on growth performance and body composition of African bonytongue fingerlings, *Heterotis niloticus* (Cuvier, 1829). **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 144-152, 2010.

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 221–234, 2007.

NICIFOROVIC, N. et al. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3125-3130, 2010.

OETTING, L. L. et al. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.4, p. 1389-1397, 2006.

OHARA, A. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: tradiocional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. *In*: MARRONI, N. P. (org). **Estresse Oxidativo e Inflamação: dos Modelos Experimentais à Clínica**. Canoas: Ed. ULBRA, p.12-24, 2008.

PUANGKAEW, J., et al. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 140, p. 187-196, 2005.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, vol. 21, p. 133-149, 2005.

SALHI, M. et al. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. **Aquaculture**, v. 231, p. 435-444, 2004.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, M. R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 789-800, 2009.

SEGNER, H. et al. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 85-105, 2012.

SHIKANGA, E.A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 567-571, 2010.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3C, p. 31-37, 1991.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156f. Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History. Stockholm, 1996.

SINGH, G. et al. Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. leaf essential oil. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, p. 701-703, 2000.

SMALL, B.C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.218, p.177-185, 2003.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733.1996.

TELES, S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 247-252, 2012.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-485, 1996.

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, p. 709-714, 2002.

VIANA, G. S. et al. Anticonvulsant activity of essential oil and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314-17, 2000.

VIJAYAVEL, K., et al. Dietary ascorbic acid and α -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 157-163, 2006.

VINCENT, A. M. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocrine Reviews**, v. 25(4), p. 612-628, 2004.

VINSON, J.A. et al. Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2800-2802, 1995.

WILHELM FILHO, D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1229-1237, 2007.

WHO, 2002. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Fact sheet n° 194, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/>> Acesso em: 17 out. 2012.

XIAO, W. W. et al. Lipid peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle and serum for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed grade levels of methionine hydroxyl analogue. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 90-97, 2012.

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**, v. 292, p. 214-218, 2009.

ZOGHBI, M. G. B. et al. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 47-48, 1998.