

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

Samuel Marasca

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA, METABOLISMO E  
PARÂMETROS OXIDATIVOS DE JUNDIÁS ALIMENTADOS COM  
DIETAS CONTENDO FOLHA DE *Lippia alba***

Santa Maria, RS  
2016

**Samuel Marasca**

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA, METABOLISMO E PARÂMETROS  
OXIDATIVOS DE JUNDIÁS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FOLHA  
DE *Lippia alba***

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lazzari

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marasca, Samuel  
CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA, METABOLISMO E PARÂMETROS  
OXIDATIVOS DE JUNDIÃS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO  
FOLHA DE *Lippia alba* / Samuel Marasca.-2016.  
64 f.; 30cm

Orientador: Rafael Lazzari  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, RS, 2016

1. Piscicultura 2. Antioxidante natural 3. Compostos  
fenólicos I. Lazzari, Rafael II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Samuel Marasca. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: samucamarasca@hotmail.com

**Samuel Marasca**

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA, METABOLISMO E PARÂMETROS  
OXIDATIVOS DE JUNDIÁS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FOLHA  
DE *Lippia alba***

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

**Aprovado em 13 de Julho de 2016:**



**Rafael Lazzari, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Vania Lucia Loro, Dra. (UFSM)**



**Viviani Corrêia, Dra. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Aurea.

## **AGRADECIMENTOS**

A concretização deste trabalho ocorreu principalmente pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Quero, portanto, agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão do mesmo.

Em especial, agradecer aos meus pais Celso Marasca e Aurea Hofer Marasca, por terem me possibilitado a vida e por sempre me incentivarem a lutar por meus objetivos.

Agradecer também, a minha namorada Valeska Pietrobelli, por todo apoio, atenção, prestatividade e compreensão.

Ao meu orientador, professor Rafael Lazzari, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos demais professores e funcionários envolvidos neste trabalho.

Aos colegas e estagiários do laboratório de Piscicultura de Palmeira das Missões-RS.

Enfim, a todos vocês, citados ou não, que dedicaram tempo, ou simplesmente desejaram que ocorresse tudo certo e da melhor forma possível na realização deste estudo, um **MUITO OBRIGADO.**

*"Sonhos determinam o que você quer.  
Ação determina o que você conquista."*

*(Aldo Novak)*

## RESUMO

### CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA, METABOLISMO E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE JUNDIÁS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FOLHA DE *Lippia alba*

AUTOR: Samuel Marasca  
ORIENTADOR: Rafael Lazzari

O uso de plantas como antioxidantes está se tornando uma alternativa importante na indústria de alimentos e de produção animal. A *Lippia alba* é uma planta nativa do Brasil que possui compostos fenólicos e óleos essenciais com elevada atividade antioxidante em sua composição. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a inclusão da folha de *L. alba* na dieta de jundiás (*Rhamdia quelen*) no crescimento, hematologia, metabolismo e parâmetros oxidativos. Para isso, foi realizado um experimento com duração de 60 dias em um sistema de recirculação de água (20 tanques/250L) com filtragem biológica. Diariamente foram realizadas análises para controle dos parâmetros químicos e físicos da água de criação. Utilizou-se 500 jundiás (peso inicial= 6,22±0,77 g) que foram distribuídos nas unidades experimentais em um delineamento experimental inteiramente casualizado (5 tratamentos e 4 repetições). A *L. alba* utilizada foi cultivada na UFSM, *campus* Frederico Westphalen - RS, Brasil. Os tratamentos testados foram: controle (sem inclusão de folha); 0,5; 1; 1,5 e 2% de inclusão do pó da folha de *L. alba*. Todas as dietas testadas tinham a mesma matriz de composição, contendo 37,49% PB e 10,04% de lipídios. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, em três refeições diárias. Ao final do experimento, foram aferidos parâmetros zootécnicos e realizada a coleta de material biológico para avaliação dos parâmetros hematológicos, metabólicos e oxidativos. Foi observada diminuição no crescimento e piora nos parâmetros hematológicos dos peixes proporcional à inclusão da folha nas dietas. Nos maiores níveis de inclusão da *L. alba*, ocorreram alterações metabólicas não desejáveis, como aumento de alanina aminotransferase no plasma, indicando dano hepático. A presença de *L. alba* nas dietas resultou em diminuição da peroxidação lipídica do músculo e aumento dos tióis não proteicos nas brânquias e no músculo. Isto indica que a planta apresenta potencial antioxidante em jundiás. Portanto, nos níveis testados, a adição do pó da folha de *L. alba* nas dietas para juvenis de jundiá não é recomendada.

**Palavras-chave:** Antinutrientes. Antioxidante natural. Compostos fenólicos. Estresse oxidativo. Piscicultura. *Rhamdia quelen*.

## ABSTRACT

### GROWTH, HEMATOLOGY, METABOLISM AND OXIDATIVE PARAMETERS OF THE SILVER CATFISH FED WITH DIETS CONTAINING *Lippia alba* LEAF

AUTHOR: SAMUEL MARASCA  
ADVISOR: RAFAEL LAZZARI

The use of plants as antioxidants is becoming a very important alternative in the food industry and animal production. The *Lippia alba* is a native plant to Brazil that possesses phenolic compounds and essential oils in composition. In this study, the aim was evaluating the inclusion of the leaf from *L. alba* in the diet from silver catfish (*Rhamdia quelen*) regarding growth, hematology, metabolism and oxidative parameters. For this, we conducted an experiment lasting 60 days in a re-use water system (20 tanks/250L) with biological filtration. Daily analyzes were performed for the control of chemical and physical parameters of the rearing water. Was used 500 silver catfish (initial weight=  $6.22 \pm 0.77$  g) which were distributed in the experimental units in a completely randomized experimental design (5 treatments and 4 repetitions). *L. alba* used was grown in UFSM, *campus* Frederico Westphalen - RS, Brazil. The treatments were: control (no addition leaf); 0.5; 1; 1.5 and 2% inclusion from *L. alba* leaf powder. All diets had the same composition matrix, containing: 37.49% PB and 10.04% lipídios. The fish were fed to apparent satiety, in three daily meals. At the end of the experiment, they were measured performance parameters and carried out the collection of biological material for evaluation of haematological, metabolic and oxidative parameters. Decrease was observed in growth and smaller in hematological parameters of fish proportional to the inclusion of the leaf in the diets. In higher levels of inclusion of *L. alba*, occurs undesirable change in metabolism, as increased from alanine aminotransferase in the plasma, indicating liver damage. The presence of *L. alba* in the diets result in a decreased lipid peroxidation of the muscle and increased of non protein thiols in the gills and muscle. This indicates that the plant has antioxidant potential to silver catfish. Therefore, at the levels tested, the addition of *L. alba* leaf powder in diets for silver catfish juveniles is not recommended.

**Keywords:** Antinutrients. Natural antioxidant. Phenolic compounds. Oxidative stress. Pisciculture. *Rhamdia quelen*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

### ARTIGO 1

- Figura 1 - **Atividade das enzimas SOD e CAT no fígado.** (A) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de pó da folha de *L. alba* nas dietas. (B) Atividade da enzima catalase (CAT) no fígado de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de pó da folha de *L. alba* nas dietas.....42

## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - Variáveis eritrocitárias de <i>Rhamdia quelen</i> mantidos sob condições controladas durante um período de 30 dias .....	17
---	----

### ARTIGO I

Tabela 1 - Consumo e parâmetros de crescimento de jundiás alimentados com pó de folha de <i>L. alba</i> .....	37
Tabela 2 - Composição corporal e de filés de jundiás alimentados com pó de folha de <i>L. alba</i> .....	38
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de jundiás alimentados com pó de folha de <i>L. alba</i> ...	39
Tabela 4 - Parâmetros metabólicos de jundiás alimentados com pó de folha de <i>L. alba</i> .....	40
Tabela 5 - Parâmetros oxidativos de jundiás alimentados com pó de folha de <i>L. alba</i> .....	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
3.1	JUNDIÁ ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	14
3.2	USO DE PLANTAS NA AQUICULTURA E <i>Lippia alba</i> .....	14
3.3	HEMATOLOGIA, METABOLISMO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES .....	16
<b>4</b>	<b>ARTIGO I.....</b>	<b>20</b>
	RESUMO .....	21
	INTRODUÇÃO .....	21
	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
	RESULTADOS.....	26
	DISCUSSÃO .....	28
	AGRADECIMENTOS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	32
	TABELAS.....	37
	FIGURAS.....	42
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
	<b>ANEXO A – IMAGEM DE EXEMPLAR DA PLANTA DE <i>Lippia alba</i></b>	
	<b>UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXO B – IMAGEM DAS FOLHAS DE <i>Lippia alba</i> UTILIZADAS NO</b>	
	<b>EXPERIMENTO .....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO C – IMAGENS DO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA</b>	
	<b>UTILIZADO NO EXPERIMENTO.....</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO D – NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL OF EXPERIMENTAL</b>	
	<b>BIOLOGY.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura é a atividade agropecuária de maior crescimento relativo em nosso país nos últimos anos e segundo informações da FAO, o Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado até 2030, ano em que a produção pesqueira nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas (MPA, 2014). Além disso, o Brasil, juntamente com Peru, Chile, China e México, são apontados como os principais países onde haverá aumento considerável no consumo per capita de pescado (FAO, 2016).

Devido à grande extensão e diversidade climática encontrada no Brasil, várias espécies de peixe têm sido estudadas para aproveitamento em aquicultura. Dentre as espécies nativas, destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*) com um total produzido de 1.747,3 toneladas em 2011 (MPA 2011). Esta espécie possui hábito alimentar onívoro e na natureza alimenta-se com uma grande variedade de alimentos, de acordo com a disponibilidade dos mesmos (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004; GOMIERO et al., 2007), aceitando bem, rações formuladas com os mais diversos ingredientes.

Assim como as demais espécies de peixes, o jundiá em seu ambiente de cultivo encontra-se sujeito a constantes fatores inerentes a aquicultura, como a manipulação, transporte, reprodução induzida, baixa qualidade da água e alta densidade de estocagem, que podem levar ao estresse, resultando em baixas taxas de crescimento e de eficiência alimentar (SMALL, 2003). Estes fatores também podem desencadear a situações de estresse oxidativo, levando a perdas irreparáveis na produção.

A utilização de plantas ou seus extratos em dietas para peixes é uma prática que vem demonstrando resultados promissores quanto a sua utilização nos últimos anos, muito pelo fato de possuírem substâncias químicas em sua composição que podem ser benéficas aos animais, atuando como antioxidantes ou promotores de crescimento. Exemplo disso, é o uso do óleo essencial de orégano (*Origanum heracleoticum*) na dieta de juvenis de *Ictalurus punctatus*, no qual ocorre uma melhora no crescimento, na capacidade antioxidante e na resistência a doenças causadas por patógenos, quando na presença do extrato (ZHENG et al., 2009).

A *Lippia alba* é um subarbusto nativo de quase todas as regiões do Brasil e possui ampla variedade de usos tradicionais e atividades farmacológicas em humanos. Entre outras atividades destaca-se o uso como: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sedativo, antiespasmódico, antimicrobiano, antiviral, tratamento de diarreia e disenteria, doenças cutâneas e doenças respiratórias (PASCUAL et al., 2001).

Na piscicultura, a utilização do óleo essencial da *L. alba* vem sendo bastante estudado nos últimos anos, para os mais diversos usos, podendo ser utilizado como anestésico (CUNHA et al., 2010), como sedativo para o transporte (AZAMBUJA et al., 2011; BECKER et al., 2012), para atrasar a peroxidação lipídica durante o armazenamento de filés (VEECK et al., 2013) e como antioxidante (SACCOL et al., 2013).

Neste contexto, o estudo da influência da inclusão do pó da folha de *L. alba* como aditivo na dieta de jundiás torna-se interessante a fim de verificar possíveis ganhos no crescimento, hematologia, metabolismo e nos parâmetros oxidativos desses animais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a inclusão da folha de *Lippia alba* na dieta de jundiás (*Rhamdia quelen*) em relação ao crescimento, hematologia, metabolismo e parâmetros oxidativos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da dieta suplementada com folha de *L. alba* nos parâmetros de crescimento em juvenis de jundiás;
- Estudar alterações hematológicas e metabólicas de jundiás submetidos a alimentação com dietas contendo folha de *L. alba*;
- Analisar as alterações no balanço de óxido-redução ocasionadas pela alimentação dos jundiás com dietas suplementadas com folha de *L. alba*;
- Definir a necessidade de um nível de inclusão de folha de *L. alba* como aditivo em dietas para o jundiá.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Inúmeras são as vantagens de cultivar espécies de peixes nativas quando comparadas às exóticas, entre elas, estão os fatos das nativas encontrar-se bem adaptadas ao clima regional e de modo geral ser bem aceitas pelo mercado consumidor (ZANIBONI-FILHO, 2000).

Espécie de ampla ocorrência, nativa da América do Sul e muito encontrada nos rios do interior do Rio Grande do Sul, o jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe teleósteano, da ordem Siluriformes e da família Heptapteridae (BARCELLOS et al., 2003). Caracteriza-se por resistir bem ao frio e por crescer rápido no verão, suportando amplitudes térmicas de 15 a 34°C (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004; GOMES et al., 2000), sendo uma espécie nativa bastante interessante para sistemas de produção nas regiões de clima temperado e subtropical (BARCELLOS et al., 2003).

O hábito alimentar do jundiá é onívoro com tendência a piscívoro e preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO; BARCELLOS, 2010). Apresenta boa produtividade em cativeiro e carne praticamente desprovida de espinhos intramusculares (CARNEIRO; MIKOS, 2005). O crescimento dos alevinos também é rápido, no qual atingem 5 cm de comprimento padrão com apenas 30 dias de idade (GOMES et al., 2000).

#### 3.2 USO DE PLANTAS NA AQUICULTURA E *Lippia alba*

Em razão do enorme crescimento da produção de peixes, é cada vez mais importante que o bem-estar desses animais em seus ambientes de cultivo seja monitorado. Para isso, é necessário entender as respostas celulares, teciduais e orgânicas dos peixes quando alimentados com rações variadas, fármacos e suplementos alimentares (FIUZA et al., 2011).

O Brasil contém cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta, sendo considerado o país que apresenta a biodiversidade mais rica do mundo. Muitas dessas plantas produzem uma grande variedade de metabólitos com diversas propriedades e podem ser utilizados como promotores de crescimento na piscicultura (MAKKAR et al., 2007).

Estratégias profiláticas focadas na nutrição para otimizar o desempenho e melhorar a saúde e a eficiência nutricional dos animais têm sido estudadas pelos mais diversos motivos. Destaca-se dentre essas estratégias, o uso de produtos naturais na dieta, no qual esses atuam

como promotores de crescimento melhorando o desempenho e a saúde do animal, devido à ação de controle dos 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).

Vários estudos são realizados buscando um aumento da produtividade das espécies cultivadas, sendo o uso de extratos vegetais como aditivos promotores de crescimento em dietas para peixes um fato ainda mais recente, porém, com resultados positivos sendo encontrados por pesquisadores em todo o mundo (SANTOS et al., 2009).

Um exemplo é o estudo realizado com juvenis de *Ictalurus punctatus*, onde ocorreu maior crescimento, melhora na capacidade antioxidante e maior resistência a doenças causadas por patógenos, quando estes peixes foram alimentados com o óleo essencial de orégano (*Origanum heracleoticum*) (ZHENG et al., 2009). Em *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas contendo alho (*Allium sativum*) em pó, também ocorreu melhor desempenho em comparação ao tratamento controle (SHALABY et al., 2006).

Espécies de *Lippia* vêm sendo exploradas na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e na aquicultura, devido ao seu potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013) e uma planta que está sendo bastante pesquisada atualmente na piscicultura é a *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*), popularmente conhecida como erva cidreira e largamente utilizada na medicina popular como analgésica, febrífuga, anti-inflamatória, antigripal e nas afecções hepáticas (AGUIAR et al., 2008). Isso se deve provavelmente pelos seus constituintes ativos, que são os seguintes: compostos fenólicos (flavonóides e feniletanóides), iridóides, taninos, saponinas triterpênicas, resinas, mucilagens e óleo essencial (HEINRICH et al., 1992; SLOWING BARILLAS, 1992).

A *L. alba* é um subarbusto aromático, cujo aroma está relacionado aos constituintes predominantes nos óleos essenciais, que podem variar qualitativamente e quantitativamente, em função de diversos fatores, como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, fatores geográficos e climáticos (CORRÊA, 1992; TAVARES et al., 2005).

A utilização do OE de *L. alba*, em dietas para juvenis de jundiás foi testada em 5 níveis (0-controle; 0,25; 0,5; 1 e 2 mL de OE/kg de dieta) durante 60 dias, onde o uso destes níveis não influenciaram os parâmetros de crescimento e de sangue, porém alteraram alguns parâmetros metabólicos e melhoraram a capacidade antioxidante dos animais (SACCOL et al., 2013). Em outro estudo parecido, porém com apenas 20 dias, foram testados os níveis de

0-controle; 0,25 e 0,5 mL de OE de *L. alba*/kg de ração, também em dietas para jundiás, onde o nível de 0,25 mostrou-se mais adequado do que o 0,5, pelo fato do último nível apresentar aumento da enzima ALT no fígado, indicando um possível dano hepático quando na utilização de doses mais elevadas do OE de *L. alba* nas dietas (SOUZA et al., 2015).

O OE de *L. alba* é recomendado para a realização do transporte de peixes, sendo que a utilização desse extrato nas concentrações entre 10 à 20 µL/L são os mais eficazes e recomendados, pois reduzem a amônia total e a perda de íons, entre outros fatores (BECKER et al., 2016). Utilizando 10 µL/L também atua como antioxidante nos breves períodos de hipoxia e hiperoxia que ocorrem durante o transporte, melhorando o bem-estar dos animais e a qualidade da carne para o consumo humano (AZAMBUJA et al., 2011). O OE de *L. alba* também é indicado como sedativo para peixes, nas concentrações de 5 à 20 mg/L para *R. quelen* (CUNHA et al., 2010) e de 10 à 20 µL/L para *Hippocampus reidi* (CUNHA et al., 2011) e como anestésico, nas concentrações de 100 à 500 mg/L para *R. quelen* (CUNHA et al., 2010) e de 50 à 450 µL/L para *H. reidi* (CUNHA et al., 2011).

Outros estudos envolvendo a *L. alba* na piscicultura são em relação a peroxidação lipídica, onde esta pode ser retardada durante o armazenamento de filés de jundiás (VEECK et al., 2013) e de carpa húngara (VEECK et al., 2015) quando na presença do OE da planta em questão e apesar da baixa atividade *in vitro* contra *Aeromonas sp.*, o OE de *L. alba* quando adicionado a água, em concentrações não muito altas, promove a sobrevivência em peixes infectados com esse gênero de bactéria (SUTILI et al., 2015).

Na literatura encontram-se vários estudos referentes ao uso da *L. alba* na piscicultura, inclusive com a espécie *R. quelen*. Porém, em todos foi utilizado o OE dessa planta, não tendo nenhum experimento que testasse a eficácia da folha de *L. alba* na forma bruta.

### 3.3 HEMATOLOGIA, METABOLISMO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES

Atualmente o conceito de alimentos funcionais tem sido aplicado na indústria alimentícia dos peixes, onde busca-se não apenas atender às exigências nutricionais, mas que as dietas também melhorem as condições de saúde dos mesmos (IBRAHEM et al., 2010). As enfermidades, de modo geral, estão relacionadas às alterações do hemograma nos animais (TAVARES-DIAS et al., 2002), sendo que este também contribui para a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condição alimentar entre outros parâmetros ecológicos (LARSSON et al., 1976). Além disso, a hematologia é uma ferramenta importante para monitorar condições de bem estar (LAZZARI et al., 2011).

Determinar valores hematológicos ideais para as espécies de peixe é bastante complicado, pois estes podem ser alterados significativamente por influência de vários fatores, como por exemplo: estado nutricional, maturação gonadal, sexo e variação genética (KORI-SIAKPERE, 1985). Além de que, diferenças na metodologia de coleta do sangue, quanto ao tipo de anticoagulante utilizado, também podem atuar como fonte de variação de resultados hematológicos em peixes (TAVARES-DIAS et al., 2002). Apesar da importância do estudo da hematologia, existem poucas referências sobre o estado de saúde dos peixes usando essas metodologias (DAL'BÓ et al., 2015). Nesse sentido, tornam-se importantes e necessários os estudos sobre a hematologia em diferentes condições nutricionais.

*Rhamdia quelen* cultivados em tanques de terra e com peso médio de 44g, apresentaram os seguintes parâmetros hematológicos: número total de eritrócitos entre  $1,55 \times 10^6$  e  $2,92 \times 10^6$   $\mu\text{L}$ , hemoglobina entre 4,95 e 9,09 g/dL, hematócrito de 17 a 34%, VCM (volume corpuscular médio) de 87,82 a 219,35fL e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) entre 20,24 e 35,91g/dL (TAVARES-DIAS et al., 2002).

Já Dal'Bó et al. (2015) em estudos com objetivo de determinar valores hematológicos de *Rhamdia quelen*, mantidos em aquários de 300 litros em um sistema de recirculação de água e controle de temperatura, obtiveram os valores apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis eritrocitárias de *Rhamdia quelen* mantidos sob condições controladas durante um período de 30 dias.

Parâmetro	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL <sup>1</sup> )	Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{l}$ )	VCM (fL)	CHCM (%)
Média	33	7,55	2,11	161,0	23,0
Mínimo	24	5,38	1,4	104,4	20,4
Máximo	43	9,57	3,6	212,3	25,4

Fonte: Adaptado de Dal'Bó et al. (2015).

Em estudos com juvenis de *R. quelen* alimentados durante 60 dias com dietas contendo adição de níveis do óleo essencial de *L. alba*, não houve alterações nas variáveis eritrocitárias. Sendo que estes apresentaram um hematócrito com valores entre 36,32 e 38,30 %, hemoglobina com valores entre 4,77 e 5,41 g/dL e CHCM com valores entre 12,21 e 14,20 g/dL. Nesse mesmo estudo, ocorreram portanto, algumas alterações metabólicas nos animais. Onde a adição do OE de *L. alba* nas dietas, resultou em uma diminuição da glicose do fígado

e aumento simultâneo do glicogênio e lactato nesse mesmo órgão. A glicose do plasma não foi alterada com a adição do OE de *L. alba* nas dietas (SACCOL et al., 2013).

As respostas de estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são as hormonais, as secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade a doenças (MOMMSEN et al., 1999). A glicose do sangue ou do plasma é um parâmetro de fácil mensuração e um bom indicador para resposta secundária de estresse (WELLS; PANKHURST, 1999), tornando o estudo do metabolismo importante na piscicultura.

O oxigênio é necessário para muitas reações metabólicas de suporte a vida. O oxigênio e seus intermediários, no entanto, podem reagir com os componentes celulares, com resultante degradação ou inativação de moléculas essenciais (CHOW, 1979). O oxigênio é bastante tóxico devido a sua natureza química, sendo um bom agente oxidante, que se reduz ao receber elétrons podendo formar intermediários reativos, também conhecidos por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o oxigênio singlete ( $1O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Quando há um desequilíbrio entre a concentração das EROs e a geração do sistema de defesa antioxidante, o quadro é denominado como estresse oxidativo, podendo levar a injúrias e até mesmo à morte celular (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005; PAVANATO; LLESUY, 2008).

O processo adaptativo de defesa atua na prevenção, eliminação das espécies ativas de oxigênio formadas e no reparo de moléculas modificadas pelas EROs (SIES, 1991), consideradas como pró-oxidantes. Já antioxidantes, são quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou mesmo impedem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A eliminação das EROs é realizada por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

O sistema de defesa enzimático, é representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx) e glutathione-redutase (GR) e minimiza os danos causados pelo estresse oxidativo (BONNEFOY et al., 2002). No qual, a SOD catalisa a transformação de duas moléculas de ânion superóxido até peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular ( $O_2$ ), a CAT reduz o peróxido de hidrogênio até água e oxigênio molecular e a GST apresenta papel protetor contra danos oxidativos, por conjugar produtos da oxidação de lipídios como aldeídos e hidroperóxidos à glutathione (HUXTABLE, 1992).

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. Este sistema atua na supressão da formação de radicais livres, por quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras destes radicais, e na eliminação ou desativação dos radicais (RIBEIRO et al., 2005). O sistema de defesa não enzimático é representado pela glutatona (GSH), pelas vitaminas A, C e E, pelos compostos polifenólicos e pelos compostos de baixo peso molecular (como os carotenóides), que atuam como varredores de radicais livres, quelantes de minerais e bloqueadores de EROs (SPADA; SILVA, 2004).

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 as plantas sintetizarem compostos antioxidantes, como produtos secundários, que são principalmente compostos fenólicos e servem como mecanismos de defesa para neutralizar as EROs, a fim de evitar o dano oxidativo. 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 está relacionada a diferentes mecanismos, tais como a eliminação de radicais livres, doação de hidrogênio, supressão do oxigênio singlete, quelação de íons metálicos e atuação como um substrato para os radicais, tais como radicais superóxido e hidroxil (NIC´IFOROVIC´ et al., 2010).

#### 4 ARTIGO I

### **Crescimento, hematologia, metabolismo e parâmetros oxidativos de jundiás alimentados com dietas contendo folha de *Lippia alba***

Samuel Marasca<sup>1</sup>, Eduardo Kelm Battisti<sup>1</sup>, Nilce Coelho Peixoto<sup>2</sup>, Juliano Uczay<sup>3</sup>, Emerson Giuliani Durigon<sup>3</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>4</sup>, Denise Schimdt<sup>5</sup>, Vania Lucia Loro<sup>6</sup>, Rafael Lazzari<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria Rio Grande do Sul 97105-900, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul 98300-000, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia e Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul 98300-000, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria Rio Grande do Sul 97105-900, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Frederico Westphalen, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul 98400-000, Brasil

<sup>6</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria Rio Grande do Sul 97105-900, Brasil

\*Autor para correspondência (rlazzari@ufsm.br)

**PALAVRAS CHAVE:** Antinutrientes, Antioxidante natural, Compostos fenólicos, Estresse oxidativo, Piscicultura, *Rhamdia quelen*

(O manuscrito será submetido ao periódico Journal of Experimental Biology)

## RESUMO

Foi realizado um experimento para avaliar o crescimento, hematologia, metabolismo e parâmetros oxidativos de jundiás alimentados com dietas contendo folha de *Lippia alba*. Utilizou-se 500 jundiás ( $6,22 \pm 0,77$  g) em sistema de recirculação de água (20 tanques/250L). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições (25 peixes/tanque). A *L. alba* utilizada foi cultivada na UFSM, *campus* Frederico Westphalen - RS, Brasil. Os tratamentos testados foram: controle (sem inclusão de folha); 0,5; 1; 1,5 e 2% de inclusão do pó da folha de *L. alba*. Todas as dietas testadas tinham a mesma matriz de composição, contendo 37,49% PB e 10,04% de lipídios. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, em três refeições diárias. Ao final do experimento, foram aferidos parâmetros zootécnicos e realizada a coleta de material biológico para avaliação dos parâmetros hematológicos, metabólicos e oxidativos. Foi observada diminuição no crescimento e piora nos parâmetros hematológicos dos peixes proporcional à inclusão da folha nas dietas. Nos maiores níveis de inclusão da *L. alba*, ocorreram alterações metabólicas não desejáveis como aumento de alanina aminotransferase no plasma, indicando dano hepático. Entretanto, a presença de *L. alba* nas dietas resultou em diminuição da peroxidação lipídica no músculo e aumento dos tióis não proteicos nas brânquias e no músculo. Isto indica que a planta apresenta potencial antioxidante em peixes. Portanto, nos níveis testados, a adição do pó da folha de *L. alba* nas dietas para juvenis de jundiá não é recomendada.

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas como antioxidantes está se tornando uma alternativa bastante importante na indústria de alimentos e de produção animal. Essa propriedade se estabelece devido às plantas sintetizarem componentes antioxidantes como produtos secundários, sendo estes principalmente caracterizados como compostos fenólicos e terpenóides, servindo como mecanismos de defesa para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs), a fim de evitar o dano oxidativo (Bakkali et al., 2008). Muitos compostos fenólicos oriundos de plantas, podem ser antioxidantes mais efetivos que as vitaminas E e C (Vinson et al., 1995; Shikanga et al., 2010).

A *Lippia alba* é uma planta nativa do Brasil que apresenta bom potencial agrônomico, por conta do seu fácil cultivo, rusticidade e rápido desenvolvimento (Yamamoto et al., 2008). Somadas a essas qualidades, também contém quantidades consideráveis de compostos

fenólicos em sua composição (Chies et al., 2013; Morais et al., 2013). Além disso, esta planta possui em sua constituição óleos essenciais (OEs) que apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro* (Stashenko et al., 2004).

Os OEs da *L. alba* quando adicionados na dieta de *Rhamdia quelen*, apresentam boa capacidade antioxidante para esses animais, principalmente pela ação do linalol (Saccol et al., 2013). A utilização dos OEs também são efetivos na indução da sedação e anestesia para a espécie *Rhamdia quelen* (Cunha et al., 2010) e *Hippocampus reidi* (Cunha et al., 2011), resultando em benefícios quando utilizado no transporte de peixes (Becker et al., 2016; Azambuja et al., 2011). Ainda, pode ser útil para retardar a peroxidação lipídica durante o armazenamento dos filés de *Rhamdia quelen* (Veeck et al., 2013) e *Cyprinus carpio* (Veeck et al., 2015).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe nativo brasileiro e é encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México (Gomes et al., 2000). Esta espécie apresenta bons índices de crescimento, razoável resistência ao manejo, boa eficiência alimentar e facilidade de reprodução e larvicultura (Radünz Neto e Borba, 2012). Além disso, é um peixe que apresenta carne saborosa e de boa aceitação do mercado consumidor (Lazzari et al., 2006), sendo portanto, uma espécie bastante indicada para produção.

A maioria das pesquisas existentes com *L. alba* para peixes, utiliza o óleo essencial (OE) da planta. No entanto, ainda não há trabalhos envolvendo a inclusão da folha na forma bruta em dietas para peixes nativos. A inclusão da folha em dietas para peixes, se justifica pela maior praticidade de coleta de material, economia na extração do óleo e facilidade de incorporação nas dietas. Além disso, a folha contém compostos que não estão presentes no OE, sendo que os mesmos podem ser benéficos aos peixes quando incluídos nas dietas. Portanto, neste estudo foi avaliado crescimento, hematologia, metabolismo e parâmetros oxidativos de jundiás alimentados com dietas contendo níveis da folha de *L. alba* na forma de pó.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e instalações

O ensaio experimental foi conduzido durante 60 dias (13 de fevereiro a 13 de abril de 2015) no Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria - *Campus* de Palmeira das Missões (UFSM-PM), localizado a 27°53'58" de latitude sul, -53°18'49" de longitude oeste e a 639 m de altitude. Foram utilizados 20 tanques (250 L) de polipropileno

(cinco tratamentos com quatro repetições) em um sistema de recirculação de água e filtragem biológica com capacidade total de 9.500 L. A água que abastecia o sistema foi proveniente de um poço artesiano do próprio campus.

### **Dietas Experimentais**

A composição e formulação das dietas utilizadas no experimento foram adaptadas de Lazzari et al. (2008). A dieta controle continha: farinha de carne e ossos (37,65%), farelo de soja (30%), milho moído (13,85%), farelo de trigo (10%), óleo de canola (3,5%), sal (1%), fosfato bicálcico (1%) e mistura vitamínica e mineral (1% (níveis de garantia por quilograma do produto– ácido fólico: 2.400 mg; ácido nicotínico: 48 g; ácido pantotênico: 24 g; biotina: 96 mg; vit. A: 2.400.000 UI; vit. D3: 400.000 UI; vit. E: 24.000 UI; vit. B1: 9.600 mg; vit. B2: 9.600 mg; vit. B6: 9.600 UI; vit. B12: 9.600 mcg; vit. K3: 4.800 mg; vit. C: 96 g; ferro: 100 g; cobre: 6.000 mg; manganês: 40 g; zinco: 6.000 mg; cobalto: 20 mg; iodo: 200 mg e selênio: 200 mg). Na dieta basal foram adicionados 4 níveis de pó da folha de *L. alba* (0,5; 1; 1,5 e 2%), totalizando 5 tratamentos. Em substituição à folha utilizou-se a celulose como material inerte para fechar a formulação das dietas. A composição analisada dessas dietas foi: PB= 37,49 ± 0,12%, lipídios= 10,04 ± 0,28%, MS= 94,94 ± 0,30% e MM= 21,22 ± 0,12%.

A *L. alba* utilizada foi cultivada no Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul (CESNORS-UFSM) - Campus Frederico Westphalen - RS, Brasil (27°22"S; 53°25"W, a 480 m de altitude). Foram coletados ramos da planta e extraiu-se as folhas dos mesmos. Após extraídas, as folhas foram secas por 48h em estufa de circulação de ar forçado a 40 °C e posteriormente moídas. O pó resultante foi o material utilizado para incluir nas dietas.

Para a confecção das dietas os ingredientes foram pesados e posteriormente misturados, manualmente, até completa homogeneização. Após, as dietas foram umedecidas, peletizadas em máquina de moer carne e levadas à estufa de circulação de ar forçado por 24 h a uma temperatura de 55°C. Posteriormente, as dietas experimentais foram acondicionadas em freezer (-20°C).

### **Animais e metodologia de fornecimento da ração**

Foram utilizados 500 juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), com peso médio inicial de 6,22 ± 0,77 g (25 por caixa). Antes do início do experimento, os animais foram acondicionados no sistema onde passaram por sete dias de adaptação. Em laboratório, os juvenis de jundiá foram submetidos à pesagem e medição para amostragem inicial do crescimento.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, em três refeições diárias (8, 13 e 18 horas) e a quantidade de ração fornecida foi mensurada diariamente a fim de determinar a porcentagem diária de consumo e para calcular a conversão alimentar aparente (CAA).

Todos os animais e procedimentos usados nesse experimento estão inseridos em um projeto global que foi aprovado no comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSM, parecer 074/2014.

### **Controle de qualidade da água**

O controle de qualidade da água foi realizado através de limpezas periódicas dos encanamentos, sifonagem diária dos resíduos e controle dos parâmetros físico-químicos da água. A temperatura, oxigênio e pH da água foram verificados diariamente, com o auxílio de oxímetro digital da marca YSI, modelo 550 e com o instrumento pH100A também da marca YSI. Semanalmente a amônia total foi determinada pela técnica do salicitato (Verdow et al., 1978) e ainda semanalmente a acidez, alcalinidade e dureza foram determinadas seguindo as técnicas descritas por Prates (2007).

A água para a realização das análises era coletada na entrada do decantador e os dados obtidos foram os seguintes: temperatura da manhã (8 h)=  $24,23 \pm 0,95^{\circ}\text{C}$ , temperatura da tarde (18 h)=  $25,21 \pm 0,85^{\circ}\text{C}$ , oxigênio dissolvido da manhã (8 h)=  $7,57 \pm 0,20$  mg/L, oxigênio dissolvido da tarde (18 h)=  $7,38 \pm 0,17$  mg/L, pH=  $7,00 \pm 0,30$ , amônia total=  $0,55 \pm 0,13$  mg/L, acidez=  $14,87 \pm 2,31$  mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , alcalinidade=  $53,75 \pm 5,93$  mg/L e dureza=  $89,59 \pm 32,40$  mg/L de  $\text{CaCO}_3$ .

### **Parâmetros de crescimento e composição corporal e de filés**

No início e no final do experimento todos os peixes foram pesados e medidos individualmente a fim de determinar os seguintes parâmetros: peso (g); ganho em peso relativo - GPR (%); ganho de peso total - GPT (g); comprimento total - CT (cm) = medida da extremidade da cabeça até o final da nadadeira caudal e comprimento padrão - CP (cm) = medida da extremidade da cabeça até a inserção da nadadeira caudal.

Ao final do experimento, foram eutanasiados por secção medular e posteriormente moídos para obtenção de amostras de composição corporal do peixe inteiro, 8 peixes por tratamento, no qual analisou-se a proteína bruta (PB), matéria seca (MS) e matéria mineral (MM) segundo AOAC (1995) e lipídios segundo Bligh and Dyer (1959). Coletou-se ainda, filés da mesma quantidade de peixes, para análise de PB, MS e MM, seguindo as metodologias anteriormente citadas.

### **Parâmetros hematológicos e metabólicos**

No final do experimento coletou-se sangue de 8 peixes por tratamento para análise dos parâmetros hematológicos. A coleta foi realizada por punção caudal com auxílio de seringas (3 mL) e agulhas (25x0,7 mm) descartáveis contendo EDTA a 10%. Analisou-se a série eritrocitária (número total, hematócrito e taxa de hemoglobina) e posteriormente calculou-se os seguintes índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Primeiramente diluiu-se o plasma em formol citrato e posteriormente fez-se a contagem total de eritrócitos com auxílio de microscópio óptico (Bioval<sup>®</sup>) em câmara de Neubauer (Loptik Labor<sup>®</sup>). A hemoglobina foi determinada por espectrofotometria (Bioespectro<sup>®</sup>) com o auxílio de um kit comercial colorimétrico. Para o cálculo dos índices utilizou-se as seguintes fórmulas:  $VCM = (\text{hematócrito} * 10) / \text{número de eritrócitos}$ ;  $HCM = (\text{hemoglobina} * 10) / \text{número de eritrócitos}$  e  $CHCM = (\text{hemoglobina} * 100) / \text{hematócrito}$ .

Coletaram-se ainda ao final do experimento, amostras de sangue e de fígado para análises metabólicas. O sangue coletado foi centrifugado (3000 rpm/minuto) para a obtenção de plasma e o fígado homogeneizado para obtenção de extratos específicos para cada análise.

No fígado analisou-se glicogênio, glicose, aminoácidos livres e alanina aminotransferase (ALT). No plasma analisou-se glicose, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total e ALT. O glicogênio foi determinado segundo Dubois et al. (1956) e os aminoácidos livres, segundo Spies (1957). As demais análises foram feitas utilizando-se kits colorimétricos comerciais (Marca: Labtest<sup>®</sup>).

### **Parâmetros de estresse oxidativo**

No final do período experimental coletou-se fígado, brânquias, encéfalo e músculo de 8 peixes por tratamento, no qual esses tecidos após coletados foram congelados em ultrafreezer (-86°C) e após isso, foram analisados os seguintes parâmetros conforme metodologias a seguir: Liporeroxidação (LPO), medida pelo teste de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS (Buege e Aust, 1978); Determinação de tióis não proteicos - NPSH (Ellman, 1959); Determinação da atividade da glutathione-S-transferase - GST (Habig et al., 1974); Determinação da atividade de catalase - CAT (Nelson e Kiesow, 1972) e determinação da atividade da superóxido dismutase - SOD (McCord e Fridovich, 1969).

A determinação das proteínas teciduais foi realizada conforme Lowry et al. (1951) e o homogeneizado dos tecidos foi feito seguindo a metodologia de cada análise específica.

### Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições. Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando não enquadrados nessa distribuição, realizou-se a detecção de observações influentes (*outliers*), que após detectados foram excluídos da análise.

Foi realizada análise de regressão linear ( $p < 0,05$ ) para o nível de inclusão de pó de folha de *L. alba*. Quando não enquadrados nessa análise, os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com a utilização do pacote estatístico Statistical Analysis System<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

### Consumo, crescimento e composição corporal e de filés

A inclusão da folha de *L. alba* na dieta de jundiás não modificou o consumo dos peixes (Tabela 1). Os peixes apresentaram um consumo médio diário de 3,14% do seu peso vivo em ração. Melhor CAA foi obtida nos peixes alimentados com a dieta controle (sem inclusão de *L. alba*) e os peixes alimentados com a dieta contendo 2% de *L. alba*, apresentaram o pior resultado para esta variável.

Em relação ao crescimento, a adição do pó da folha de *L. alba* nas dietas resultou em diminuição dos valores de todos os parâmetros avaliados (Tabela 1). O valor do GPR nos peixes do tratamento controle foi de  $323,85 \pm 6,58\%$ , representando um aumento no peso dos peixes ao final do experimento de mais de três vezes em relação ao seu peso inicial. Os valores desta variável apresentaram efeito linear negativo, no qual o mesmo decresce até o valor de  $236,91 \pm 6,63\%$  no tratamento com 2% de adição da folha. Também ocorreu efeito linear negativo no peso final, CT e GPT. Já no CP não ocorre um efeito linear, porém na dieta com 2% de inclusão de *L. alba* os peixes apresentaram um valor estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao tratamento controle.

A adição de *L. alba* na dieta de jundiás, resultou na diminuição da MS dos filés (Tabela 2). Os demais parâmetros de composição corporal do filé (PB e MM) e peixe inteiro (PB, MS, MM e lipídios) não foram alterados nos diferentes tratamentos testados.

### Parâmetros hematológicos e metabólicos

A medida que os níveis de inclusão do pó da folha de *L. alba* são aumentados, ocorre uma diminuição significativa dos eritrócitos, da hemoglobina e do CHCM, porém um aumento no VCM e HCM. O hematócrito não apresentou efeito significativo entre os diferentes tratamentos testados (Tabela 3).

Em relação aos dados metabólicos, ocorre um aumento do glicogênio e da glicose hepática no nível de 2% de inclusão de *L. alba* e diminuição dos aminoácidos neste mesmo nível de inclusão. A ALT, também foi alterada com a adição da folha nas dietas ( $p < 0,05$ ), onde o menor valor foi encontrado nos tratamentos 0,5 e 1% (Tabela 4).

No plasma, a glicose mensurada foi maior no nível de 2% quando comparado aos demais tratamentos e a ALT indicou maiores valores nos níveis mais altos de inclusão (1,5 e 2%). As proteínas, triglicerídeos e colesterol do plasma não foram alterados ( $p > 0,05$ ) com a adição do pó da folha de *L. alba* nas dietas (Tabela 4).

### Parâmetros de estresse oxidativo

A atividade hepática da enzima SOD, apresentou sua menor ação nos peixes alimentados com 1% de *L. alba*, sendo esse valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle (Fig. 1A). A atividade da enzima CAT, neste mesmo órgão, apresentou efeito linear negativo ( $Y = 4,15 - 0,81X$ ,  $r^2 = 0,97$ ) proporcional a adição de *L. alba* nas dietas (Fig. 1B). Os demais parâmetros oxidativos avaliados no fígado (TBARS, NPSH e GST) não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos testados (Tabela 5).

Nas brânquias o NPSH e a GST foram alterados com a adição da *L. alba* nas dietas, onde o NPSH foi maior quando adicionou-se 2% de *L. alba* na ração e a GST foi maior no nível de 1,5% de adição. A TBARS nas brânquias não foi alterada entre os diferentes tratamentos ( $P > 0,05$ ).

No encéfalo, apenas os NPSH foram alterados entre os parâmetros estudados neste órgão, no qual houve maior ação no nível de 1,5% de adição de *L. alba*, porém o nível de 2% apresentou queda nesse valor, não diferindo do tratamento controle.

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo estudados no músculo, obteve-se uma maior quantidade de TBARS no grupo controle em comparação a todos os tratamentos contendo *L. alba* na alimentação dos peixes. Os NPSH aumentaram proporcionalmente a adição de *L. alba* nas dietas dos jundiás. A GST do músculo não foi alterada com a adição da *L. alba* nas dietas.

## DISCUSSÃO

### **Crescimento e composição corporal e de filés**

O desempenho observado nos jundiás deste experimento, em todos os tratamentos estudados, apresentaram bons índices de crescimento. Entretanto, ocorreu uma diminuição na taxa de crescimento dos peixes a medida em que se aumentou a inclusão do produto nas rações. O mesmo não ocorreu quando apenas o OE dessa planta foi adicionado nas dietas do jundiá, no qual não houve influência nos parâmetros de crescimento (Sacol et al., 2013). A diminuição no desempenho destes peixes, portanto, deve estar relacionada a compostos presentes na folha e que não estão presentes em outros produtos, como OE. Estes produtos provavelmente atuaram como antinutrientes nos peixes.

Taninos são antinutrientes para peixes (Bergamin et al., 2013), por conta dos efeitos adversos que causam na digestibilidade da proteína, carboidratos e minerais (Benevides et al., 2011). Também podem diminuir a atividade de enzimas digestivas, causar danos à mucosa do sistema digestivo e exercer efeitos tóxicos sistêmicos aos animais (Sreerama et al., 2010). Pansera et al. (2003), analisando taninos totais presentes em plantas aromáticas cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul, observaram que a *L. alba* possui altos teores desse composto fenólico em sua composição, contendo 18,9% de taninos totais na planta (% equivalente ao ácido tânico). Este valor é considerado alto, visto que espécies conhecidas por apresentarem altos índices desse composto apresentam no máximo 20% de taninos totais.

Resultado semelhante a este em relação ao desempenho, foi encontrado em estudos com *Leporinus macrocephalus* arraçoados com dietas contendo diferentes teores de taninos, onde a presença desses também resultou em uma tendência linear decrescente no ganho de peso. Neste estudo, os autores recomendam uma concentração não superior a 0,46% de taninos totais na ração de peixes dessa espécie, para que o desempenho não seja alterado (Pinto et al., 2001). Portanto, os taninos presentes na folha de *L. alba*, podem ser o principal antinutriente que diminuiu a taxa de crescimento dos jundiás (Tabela 1).

Apesar de ocorrer diminuição da MS do filé com a adição do pó da folha de *L. alba* nas dietas dos jundiás, não se tem grandes alterações bromatológicas na composição. Os demais componentes (PB e MM) se encontram dentro dos valores médios de filés de jundiá desta faixa de peso (Lazzari et al., 2008). A composição corporal dos peixes não foi influenciada pela adição de *L. alba*, mantendo-se similares a valores encontrados na literatura para a espécie (Melo et al., 2002).

### Hematologia e metabolismo

A adição de *L. alba* resultou em uma diminuição no número de eritrócitos e da taxa de hemoglobina. Já o hematócrito não foi alterado pelas diferentes dietas testadas, o que pode ser explicado pelo aumento do VCM. Em relação à HCM houve um aumento de aproximadamente 50% quando a *L. alba* foi adicionada, enquanto que o VCM aumentou cerca de 280%. Houve, portanto, um aumento na quantidade de hemoglobina contida em cada eritrócito, porém o mecanismo compensatório não foi total, ocasionando a diminuição da CHCM. Esses resultados hematológicos remetem a um quadro anêmico diretamente proporcional aos níveis de inclusão do pó da folha de *L. alba* na ração, o que pode estar associado ao menor desempenho produtivo desses animais.

A diminuição da taxa de hemoglobina pode ter sido ocasionada pela menor biodisponibilidade do ferro, que por sua vez pode estar relacionada com a presença de fatores antinutricionais inibidores da absorção desse mineral (Aguiar et al., 2014). Esses antinutrientes podem ser os taninos ou outros compostos fenólicos, no qual estes podem diminuir a absorção do ferro, pelo fato de formarem complexos insolúveis entre si, afetando a biodisponibilidade do mineral (Carvalho et al., 2006). Resultado que corrobora com este, foi encontrado num estudo com a adição de taninos na dieta de *Labeo rohita*, onde na presença desse composto, também ocorreu diminuição dos eritrócitos e da taxa de hemoglobina dos peixes avaliados (Prusty et al., 2007).

A determinação da glicose plasmática é importante para o conhecimento do metabolismo dos peixes em função das alterações da dieta (Kumar et al., 2010), além de servir como indicativo de estresse (Al-Asgah et al., 2015). A glicemia aumentada no grupo alimentado com a maior quantidade de *L. alba* (2%), sugere a presença de algum composto químico que inibe a secreção de insulina ou aumenta a resistência a ela. A quantidade de glicose encontrada no fígado também aumentou quando os animais foram tratados com 2% de *L. alba*, entretanto como esse carboidrato não é estocado nesse tecido acredita-se que essa glicose encontrada seja aquela que circula no sangue neste órgão. Em *Colossoma macropomum* expostos ao OE de *L. alba* nas concentrações de 100 e 150 mg/L na água durante 30 minutos, ocorre aumento significativo da glicose plasmática em ambas as concentrações quando comparadas ao grupo controle, onde os autores correlacionam esse aumento com o estresse causado pelas alterações nas brânquias (Soares et al., 2016), sendo que animais recebendo 2% de pó da folha de *L. alba* nas dietas, poderiam estar mais estressados.

O aumento no glicogênio hepático verificado no grupo de 2% de adição da *L. alba*, remete à uma alta velocidade gliconeogênica, tendo como precursor AA, uma vez que os níveis destes diminuíram e a atividade da ALT estava aumentada nesse grupo. Em jundiás transportados em águas contendo concentrações de 30 e 40 µL/L do OE de *L. alba* para sedação dos mesmos, ocorre um efeito contrário em relação ao glicogênio presente no fígado, onde este diminui consideravelmente em comparação aos peixes transportados em águas sem OE de *L. alba* (Becker et al., 2016).

Quando ocorre um dano tecidual no fígado, há uma liberação de enzimas específicas desse órgão para a corrente sanguínea, como por exemplo a ALT (Colak et al., 2016; Chen et al., 2004; Kumar et al., 2010). Nesse sentido, o aumento da ALT no plasma dos peixes alimentados com 1,5 e 2% de pó da folha de *L. alba*, indica dano hepático nesses animais. O aumento dessa transaminase no plasma, também foi encontrado em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes concentrações de cádmio (Al-Asgah et al., 2015) e de zinco (Younis et al., 2012), onde ambos os autores também relacionam esse aumento ao dano hepático.

### **Estresse oxidativo**

As enzimas CAT e SOD, tem papel importante no organismo animal devido a sua função antioxidante (Menezes et al., 2016). A diminuição proporcional na atividade da enzima CAT no fígado com o aumento dos níveis de *L. alba* e o menor valor da SOD nesse mesmo órgão no nível de 1% de adição do produto, podem indicar um mecanismo tóxico induzido pelos compostos presentes na folha da *L. alba*.

A GST é considerada uma importante enzima de desintoxicação e tem papel importante na proteção contra a peroxidação lipídica, pelo fato de metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos orgânicos, por meio da conjugação destes com a glutathiona reduzida (GSH), formando substâncias de baixa toxicidade (Yang et al., 2001). Neste estudo, foram encontradas alterações na atividade da GST apenas nas brânquias, possivelmente pelo maior contato desse órgão com o oxigênio e a maior propensão na formação das EROs. Esse aumento da GST pode representar uma melhora no mecanismo protetor contra as EROs, impedindo assim seus efeitos indesejáveis. Em jundiás alimentados com o OE de *L. alba*, ocorreu aumento de atividade da GST nas brânquias, no fígado e no cérebro, onde nesse caso, ocorreu uma diminuição paralela da LPO em dois desses órgãos, nas brânquias e no fígado (Saccol et., 2013), mostrando efeito protetor ao aumentar a atividade dessa enzima.

O aumento dos NPSH nas brânquias e no músculo, com a adição da *L. alba* e o maior valor desses tióis no nível de 1,5% de adição, também indicam maior capacidade antioxidante dos peixes quando na presença dos compostos químicos da *L. alba* nas dietas, pois os NPSH podem atuar contra a formação das EROs e na manutenção do equilíbrio redox (Reischl et al., 2007).

A diminuição da TBARS no músculo indica que a inclusão de qualquer nível de *L. alba* na forma de pó de folha nas dietas reduz a taxa de oxidação lipídica desse tecido, o que na prática é interessante por aumentar o tempo de vida de prateleira dos filés quando utilizado em animais de produção. Veeck et al. (2015) avaliando filés de carpa húngara congelados, tratados com extratos de *L. alba*, encontraram efeitos parecidos, no qual também baixou os níveis de TBARS, revelando retardamento da oxidação lipídica dos filés armazenados.

A ação antioxidante da *L. alba* pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, pois essa planta possui boas quantidades desses componentes, que podem variar em função das condições de cultivo da planta e do clima (Chies et al., 2013; Morais et al., 2013). Os compostos fenólicos possuem poder antioxidante devido a sua estrutura química, apresentando hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros (Angelo e Jorge, 2007). Estas estruturas químicas podem reagir e estabilizar radicais livres, diminuindo o dano oxidativo (Vaccari et al., 2009).

Outro fator que pode explicar essa capacidade antioxidante apresentada neste trabalho, é a presença dos compostos químicos que constituem o OE da planta em questão. A composição química do OE da *L. alba* coletada no mesmo local da planta utilizada neste estudo, apresentou o linalol como sendo o composto majoritário, representando 47,66% do total de constituintes desse extrato (Hohlenwerger et al., 2016). Em estudos recentes, a presença do linalol foi relacionado com uma melhora na capacidade antioxidante de juvenis de jundiá, quando estes foram alimentados com dietas contendo o OE de *L. alba* nas dietas (Saccol et al., 2013).

A adição do pó da folha de *L. alba* em dietas para o jundiá, apresenta um potencial antioxidante, devido a presença de OEs e compostos fenólicos. Por outro lado, a adição desta planta afeta negativamente o crescimento, a hematologia e os parâmetros metabólicos dos juvenis de jundiás, provavelmente por ter antinutrientes em sua composição. Portanto, nos níveis testados no presente estudo, a adição do pó da folha de *L. alba* não é recomendada para juvenis de jundiá.

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas e estagiários do laboratório de piscicultura de Palmeira das Missões-RS pela ajuda na condução do experimento e à CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar, J. P. L., Yuyama, L. K. O., Souza, F. C. A. and Pessoa, A.** (2014). Biodisponibilidade do ferro do jambu (*Spilanthes oleracea* L.): estudo em murinos. *Rev Pan-Amaz Saude.* **5(1)**, 19-24.
- Al-Asgah, N. A., Abdel-Warith, A-W. A., Younis, E-S. M. and Allam, H. Y.** (2015). Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. *Saudi Journal of Biological Sciences.* **22**, 543-550.
- Angelo, P. M. and Jorge, N.** (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **66(1)**, 1-9.
- AOAC.** (1995). Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, Ed. **16**, 1137.
- 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. and Liesuy, 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.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology.* **46**, 446-475.
- Becker, A. G., Parodi, T. V., Zeppenfeld, C. C., Salbego, J., Cunha, M. A., Heldwein, C. G., Loro, V. L., Heinzmann, B. M. and Baldisserotto, B.** (2016). Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. *Fish Physiol Biochem.* **42**, 73-81.
- Benevides, C. M. J., Souza, M. V., Souza, R. D. B. and Lopes, M. V.** (2011). Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional.* **18(2)**, 67-79.
- Bergamin, G. T., Veiverberg, C. A., Silva, L. P., Pretto, A., Siqueira, L. V. and Radünz Neto, J.** (2013). Extração de antinutrientes e aumento da qualidade nutricional dos farelos de girassol, canola e soja para alimentação de peixes. *Ciência Rural.* **43(10)**, 1878-1884.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37(8)**, 911-917.
- Buege, J. A. and Aust, S. D.** (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302-310.

- Carvalho, M. C., Baracat, E. C. E. and Sgarbieri, V. C.** (2006). Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro. *Segurança Alimentar e Nutricional*. **13**(2), 54-63.
- Chen, C. Y., Wooster, G. A. and Bowser, P. R.** (2004). Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture*. **239**, 421-443.
- Chies, C. E., Branco, C. S., Scola, G., Agostini, F., Gower, A. E. and Salvador, M.** (2013). Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. *Antioxidants*. **2**, 194-205.
- Colak, E., Ustuner, M. C., Tekin, N., Colak, E., Burukoglu, D., Degirmenci, I. and Gunes, H. V.** (2016). The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride- induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *Springer Plus*. **5**:216, 1-9.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T. and Baldisserotto, B.** (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. **306**, 403-406.
- Cunha, M. A., Silva, B. F., Delunardo, F. A. C., Benovit, S. C., Gomes, L. C., Heinzmann, B. M. and Baldisserotto, B.** (2011). Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*. **9**(3), 683-688.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-358.
- Ellman, G. L.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **82**, 70-77.
- Gomes, L. C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C. and Baldisserotto, B.** (2000). Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*. **30**, 179-185.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.** (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. **249**(22), 7130-7139.
- Hohlenwerger, J. C., Copatti, C. E., Sena, A. C., Couto, R. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Caron, B. O. and Schmidt, D.** (2016). Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)?. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. **49**, 119-126.
- Kumar, V., Makkar, H. P. S., Amselgruber, W. and Becker, K.** (2010). Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. *Food and Chemical Toxicology*. **48**, 2063-2072.

- Lazzari, R., Radünz Neto, J., Emanuelli, T., Pedron, F. A., Costa, M. L., Losekann, M. E., Correia, V. and Bochi, V. C.** (2006). Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*. **36**, 240-246.
- Lazzari, R., Radünz Neto, J., Pedron, F. A., Veiverberg, C. A., Bergamin, G. T., Lima, R. L., Emanuelli, T. and Steffens, C.** (2008). Desempenho e composição dos filés de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes dietas na fase de recria. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **60(2)**, 477-484.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193(1)**, 265-275.
- McCord, J. M. and Fridovich, I.** (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. **244(22)**, 6049-6055.
- Melo, J. F. B., Radünz Neto, J., Silva, J. H. S. and Trombetta, C. G.** (2002). Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. *Ciência Rural*. **32(2)**, 323-327.
- Menezes, C., Martins, A., Murussi, C., Preto, A., Leitemperger, J. and Loro, V. L.** (2016). Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. *Science of the Total Environment*. **542**, 231-237.
- Morais, S. M., Lima, K. S. B., Siqueira, S. M. C., Cavalcanti, E. S. B., Souza, M. S. T., Menezes, J. E. S. A. and Trevisan, M. T. S.** (2013). Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Rev. Bras. Pl. Med.* **15(4)**, 575-582.
- Nelson, D. P. and Kiesow, L. A.** (1972). Entalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C. *Analytical Biochemistry*. **49**, 474-479.
- Pansera, M. R., Santos, A. C. A., Paese, K., Wasum, R., Rossato, M., Rota, L. D., Pauletti, G. F. and Serafini, L. A.** (2003). Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **13**, 17-22.
- Pinto, L. G. Q., Pezzato, L. D., Miranda, E. D. and Barros, M. M.** (2001). Desempenho do Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) Arraçoado com Dietas Contendo Diferentes Teores de Tanino. *Rev. Bras. Zootec.* **30(4)**, 1164-1171.
- Prates, E. R.** (2007). Técnicas de pesquisa em nutrição animal. Porto Alegre, RS: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Prusty, A. K., Sahu, N. P., Pal, A. K., Reddy, A. K. and Kumar, S.** (2007). Effect of dietary tannin on growth and haemato-immunological parameters of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Animal Feed Science and Technology*. **136**, 96-108.

- Radünz Neto, J. and Borba, M. R.** (2012). Exigências nutricionais e alimentação do Jundiá. In NUTRIAQUA (ed. Fracalossi, D. M. and Cyrino, J. E. P.). Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 241-253.
- Reischl, E., Dafre, A. L., Franco, J. L. and Wilhelm-Filho, D.** (2007). Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **146**, 22-53.
- Saccol, E. M. H., Uczay, J., Pês, T. S., Finamor, I. A., Ourique, G. M., Riffel, A. P. K., Schmidt, D., Caron, B. O., Heinzmann, B. M., Liesuy, S. F., et al.** (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*. **416-417**, 244-254.
- Shikanga, E. A., Combrinck, S. and Regnier, T.** (2010). South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*. **76**, 567-571.
- Soares, B. V., Neves, L. R., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Dias, M. K. R., Chagas, E. D. and Tavares-Dias, M.** (2016). Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*. **452**, 107-114.
- Spies, J. R.** (1957). Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in Enzymology*. **3**, 467-477.
- Sreerama, Y. N., Neelam, D. A., Sashikala, V. B. and Pratapa, V. M.** (2010). Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. *J. Agric. Food Chem.* **58(7)**, 4322-4330.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. and 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 A*. **1025(1)**, 93-103.
- Vaccari, N. F. S., Soccol, M. C. H. and Ide, G. M.** (2009). Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. **8**, 71-83.
- Veeck, A. P. L., Klein, B., Ferreira, L. F., Becker, A. G., Heldwein, C. G., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B. and Emanuelli, T.** (2013). Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **93**, 955-960.
- Veeck, A. P. L., Klein, B., Ruviaro, A. R., Quatrin, A., Ferreira, L. F., Daniel, A. P., Piccolo, J., Oliveira, M. S., Mallmann, C. A., Heinzmann, B. M., et al.** (2015). Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos de *Lippia alba*. *Ciência Rural*. **45(6)**, 1113-1119.

- Verdow, H., Van Echteld, C. J. A. and Dekkers, E. M. J.** (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*. **12**, 399-402.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M. and Jang, J.** (1995). Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an *in Vitro* Oxidation Model for Heart Disease. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2800-2802.
- Yamamoto, P. Y., Colombo, C. A., Azevedo Filho, J. A., Lourenção, A. L., Marques, M. O. M., Morais, G. D. S., Chiorato, A. F., Martins, A. L. M. and Siqueira, W. J.** (2008). Performance of ginger grass (*lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. *Sci. Agric.* **65**, 481-489.
- Yang, Y., Cheng, J. Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S. and Awasthi, Y. C.** (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* **276(22)**, 19229-19230.
- Younis, E. M., Abdel-Warith, A. A. and Al-Asgah, N. A.** (2012). Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during short and long term sublethal exposure to zinc. *African Journal of Biotechnology*. **11(19)**, 4442-4446.

## TABELAS

Tabela 1 - Consumo e parâmetros de crescimento de jundiás alimentados com pó de folha de *L. alba*.

*Parâmetros	Pó de <i>L. alba</i> (%)					P
	0	0,5	1	1,5	2	
Cons (% PV)	3,10±0,03	3,07±0,13	3,32±0,13	2,99±0,14	3,23±0,10	NS
CAA	1,50±0,02 <sup>b</sup>	1,56±0,08 <sup>ab</sup>	1,69±0,06 <sup>ab</sup>	1,59±0,06 <sup>ab</sup>	1,79±0,04 <sup>a</sup>	0,03
Peso (g) <sup>1</sup>	26,36±0,40	24,22±0,72	24,18±0,50	22,28±0,24	20,96±0,43	<0,0001
GPR (%) <sup>2</sup>	323,85±6,58	288,81±11,50	288,91±7,85	258,80±3,99	236,91±6,63	<0,0001
GPT (g) <sup>3</sup>	20,14±0,81	17,99±1,44	17,96±0,99	16,07±0,49	14,73±0,85	<0,0001
CT (cm) <sup>4</sup>	14,96±0,27	14,56±0,23	14,61±0,26	14,12±0,13	13,90±0,48	<0,0001
CP (cm)	12,17±0,25 <sup>a</sup>	12,07±0,30 <sup>ab</sup>	12,16±0,25 <sup>a</sup>	11,69±0,17 <sup>ab</sup>	11,49±0,39 <sup>b</sup>	0,01

Valores expressos como média ± erro padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05). \*Parâmetros: Cons - consumo, CAA - conversão alimentar aparente, GPR - ganho em peso relativo, GPT - ganho de peso total, CT - comprimento total, CP - comprimento padrão.

<sup>1</sup>efeito linear:  $Y=26,15-2,55X$ ,  $r^2=0,79$ ;

<sup>2</sup>efeito linear:  $Y=320,23-40,77X$ ,  $r^2=0,79$ ;

<sup>3</sup>efeito linear:  $Y=19,93-2,54X$ ,  $r^2=0,79$ .

<sup>4</sup>efeito linear:  $Y=14,94-0,51X$ ,  $r^2=0,63$ ;

Tabela 2 - Composição corporal e de filés de jundiás alimentados com pó de folha de *L. alba*.

Parâmetros	Pó de <i>L. alba</i> (%)					p
	0	0,5	1	1,5	2	
<b>Filé</b>						
PB (%)	18,90±0,29	19,06±0,14	18,87±0,16	18,80±0,41	18,38±0,08	NS
MS (%)*	21,12±0,04	20,87±0,06	20,87±0,07	20,13±0,03	20,07±0,06	<0,0001
MM (%)	1,63±0,01	1,67±0,05	1,61±0,05	1,70±0,03	1,65±0,02	NS
<b>Peixe inteiro</b>						
PB (%)	15,51±0,16	15,61±0,07	15,33±0,26	14,95±0,44	15,56±0,50	NS
MS (%)	21,76±0,14	21,80±0,13	21,94±0,11	22,25±0,11	22,20±0,14	NS
MM (%)	3,05±0,11	2,90±0,005	2,73±0,08	2,93±0,07	3,09±0,12	NS
LIP (%)	2,27±0,22	2,23±0,47	2,39±0,31	2,31±0,13	2,60±0,05	NS

Valores expressos como média ± erro padrão. \*Efeito linear:  $Y=21,22-0,57X$ ,  $r^2= 0,83$ . Parâmetros: PB - proteína bruta, MS - matéria seca, MM - matéria mineral, LIP - lipídios.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos de jundiás alimentados com pó de folha de *L. alba*.

*Parâmetros	Pó de <i>L. alba</i> (%)					p
	0	0,5	1	1,5	2	
Hematócrito (%)	27,56±1,03	28,56±1,72	25,37±1,51	24,12±1,08	24,87±0,71	NS
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μL) <sup>1</sup>	4,12±0,34	3,12±0,26	2,95±0,51	1,46±0,07	1,43±0,08	***
Hemoglobina (g/dL) <sup>2</sup>	10,61±0,39	9,38±0,52	8,21±0,32	7,53±0,52	6,46±0,20	***
VCM (fL) <sup>3</sup>	61,88±5,96	76,18±8,11	63,87±8,29	151,62±6,02	172,32±7,65	***
HCM (pg) <sup>4</sup>	27,24±3,50	30,58±1,48	26,37±2,95	45,60±2,07	42,32±1,82	***
CHCM (g/dL) <sup>5</sup>	39,86±1,27	33,89±0,90	31,34±0,84	30,31±1,51	23,38±0,54	***

Valores expressos como média ± erro padrão. \*VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média.

\*\*\*=p<0,0001; NS= não significativo (P>0,05).

<sup>1</sup>efeito linear: Y=4,66-1,73X, r<sup>2</sup>=0,75;

<sup>2</sup>efeito linear: Y=10,41-2,03X, r<sup>2</sup>=0,64;

<sup>3</sup>efeito linear: Y=40,74+64,41X, r<sup>2</sup>=0,76;

<sup>4</sup>efeito linear: Y=20,53+12,20X, r<sup>2</sup>=0,58;

<sup>5</sup>efeito linear: Y=40,45-7,96X, r<sup>2</sup>=0,78;

Tabela 4 - Parâmetros metabólicos de jundiás alimentados com pó de folha de *L. alba*.

Parâmetros	Pó de <i>L. alba</i> (%)					p
	0	0,5	1	1,5	2	
<b>FÍGADO*</b>						
Glicogênio	150,82±13,17 <sup>b</sup>	149,17±25,21 <sup>b</sup>	140,38±16,22 <sup>b</sup>	146,71±14,39 <sup>b</sup>	259,43±28,24 <sup>a</sup>	0,002
Glicose	14,29±1,64 <sup>b</sup>	17,76±2,90 <sup>ab</sup>	11,84±1,43 <sup>b</sup>	11,87±1,29 <sup>b</sup>	23,26±2,06 <sup>a</sup>	0,0006
AA	67,40±1,75 <sup>ab</sup>	80,95±2,71 <sup>a</sup>	78,91±6,83 <sup>ab</sup>	67,98±5,73 <sup>ab</sup>	58,37±4,34 <sup>b</sup>	0,03
ALT	3,24±0,29 <sup>a</sup>	1,80±0,17 <sup>b</sup>	1,69±0,30 <sup>b</sup>	4,05±0,44 <sup>a</sup>	4,49±0,24 <sup>a</sup>	<0,0001
<b>PLASMA**</b>						
Glicose	30,10±2,69 <sup>b</sup>	40,99±2,89 <sup>b</sup>	42,32±3,43 <sup>b</sup>	44,91±3,73 <sup>b</sup>	69,82±6,28 <sup>a</sup>	<0,0001
Proteínas	2,24±0,10	2,52±0,09	2,37±0,08	2,60±0,10	2,51±0,05	NS
Triglicerídeos	200,98±16,61	190,85±14,18	208,11±20,34	185,01±7,42	189,06±23,77	NS
Colesterol	111,47±3,38	114,25±3,88	107,76±5,45	111,62±1,82	109,86±4,23	NS
ALT	5,10±0,52 <sup>c</sup>	7,01±0,57 <sup>bc</sup>	7,30±0,48 <sup>bc</sup>	11,21±0,24 <sup>a</sup>	9,88±0,72 <sup>ab</sup>	0,0003

Valores expressos como média ± erro padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05). Parâmetros: \*Fígado= Glicogênio (μmol/g tecido), Glicose (mg/g tecido), AA - Aminoácidos (μmol/g tecido), ALT - alanina aminotransferase (UI/g tecido); \*\*Plasma= Glicose (mg/dL), Proteínas (g/dL), Triglicerídeos (mg/dL), Colesterol (mg/dL), ALT - alanina aminotransferase (UI/L).

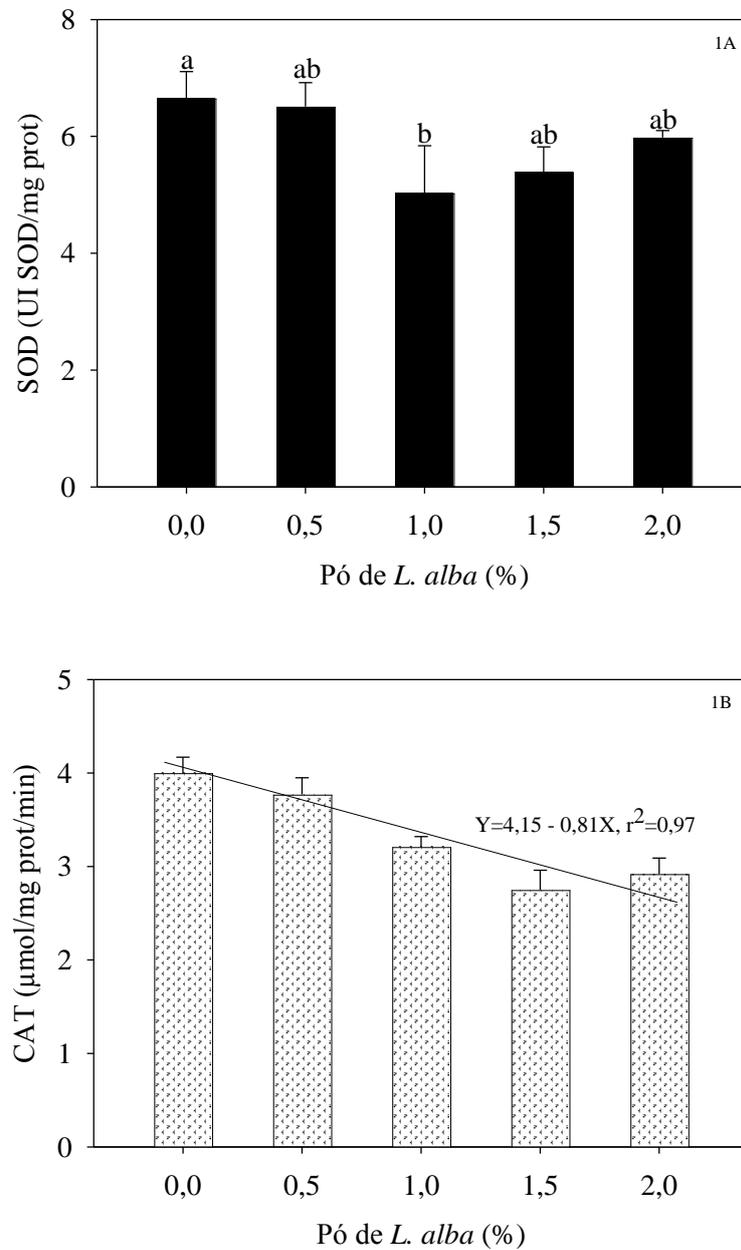
Tabela 5 - Parâmetros oxidativos de jundiás alimentados com pó de folha de *L. alba*.

*Parâmetros	Pó de <i>L. alba</i> (%)					p
	0	0,5	1	1,5	2	
<b>Fígado</b>						
TBARS	4,43±0,49	3,96±0,28	3,85±0,63	4,20±0,32	3,51±0,47	NS
NPSH	0,48±0,02	0,44±0,01	0,41±0,01	0,49±0,02	0,48±0,01	NS
GST	0,39±0,01	0,38±0,02	0,33±0,02	0,34±0,01	0,38±0,01	NS
<b>Brânquias</b>						
TBARS	2,64±0,19	2,28±0,08	2,42±0,08	2,28±0,12	2,39±0,08	NS
NPSH	0,34±0,02 <sup>b</sup>	0,36±0,004 <sup>ab</sup>	0,39±0,008 <sup>ab</sup>	0,38±0,004 <sup>ab</sup>	0,40±0,006 <sup>a</sup>	0,01
GST	0,25±0,01 <sup>b</sup>	0,27±0,01 <sup>b</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,33±0,02 <sup>a</sup>	0,29±0,02 <sup>ab</sup>	0,03
<b>Encéfalo</b>						
TBARS	4,96±0,32	5,55±0,36	5,96±0,29	5,23±0,43	5,17±0,28	NS
NPSH	0,20±0,008 <sup>bc</sup>	0,25±0,01 <sup>ab</sup>	0,24±0,01 <sup>b</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,017 <sup>c</sup>	<0,0001
GST	0,11±0,006	0,09±0,008	0,08±0,006	0,11±0,01	0,11±0,004	NS
<b>Músculo</b>						
TBARS	1,33±0,05 <sup>a</sup>	0,70±0,04 <sup>b</sup>	0,71±0,10 <sup>b</sup>	0,62±0,05 <sup>b</sup>	0,65±0,07 <sup>b</sup>	<0,0001
NPSH <sup>1</sup>	0,20±0,004	0,21±0,005	0,22±0,004	0,23±0,007	0,26±0,007	0,01
GST	0,08±0,008	0,08±0,008	0,08±0,007	0,09±0,01	0,08±0,007	NS

Valores expressos como média ± erro padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). \*Parâmetros: TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol MDA/mg proteína), NPSH - tióis não protéicos (μmol SH/g tecido), GST - glutathione-S-transferase (μmol GS-DNB/min/mg proteína).

<sup>1</sup>efeito linear: Y=0,20+0,02X, r<sup>2</sup>=0,90.

## FIGURAS



**Figura 1. Atividade das enzimas SOD e CAT no fígado.** (A) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de pó da folha de *L. alba* nas dietas. (B) Atividade da enzima catalase (CAT) no fígado de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de pó da folha de *L. alba* nas dietas. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

- A inclusão da folha de *L. alba* nas dietas de jundiás resulta em diminuição da taxa de crescimento;
- A inclusão da folha de *L. alba* afeta negativamente a hematologia e o metabolismo de jundiás;
- A folha de *L. alba* apresenta potencial antioxidante quando adicionada nas dietas de jundiás;
- A folha de *L. alba*, nos níveis testados, não é recomendada como aditivo para juvenis de jundiás.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, 2008.
- 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.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria, Ed. UFSM, p. 222, 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ-NETO, J.; BARCELLOS, L. G. Jundiá (*Rhamdia* sp) In: BALDISSEROTTO B.; GOMES L. C. (Org.) **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**, Santa Maria: UFSM, p. 608, 2010.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1565-1469, 2003.
- BECKER, A. G. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiol Biochem**. v. 38, p. 789-796, 2012.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.
- 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.
- CHOW, C. K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, p. 1066-1081, 1979.
- CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson - erva-cidreira. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 73, p. 57-64, 1992.
- 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.
- DAL'BÓ, G. A. et al. Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 2, p. 439-446, 2015.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture, 2016**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 05 jul. 2016.
- FIUZA, T. S. et al. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) - Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, 2011.

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

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 1454-1468, 1999.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 63-80, 1992.

HUXTABLE, R. J. Physiological Actions of Taurine. **Physiological Reviews**. v. 72, n. 1, p. 63, 1992.

IBRAHEM, M. D. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin con the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 241-246, 2010.

KORI-SIAKPERE, O. Hematological characteristics of *Clariasisheriensis Sydenham*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 27, p. 259-63, 1985.

LARSON, A.; JOHANSSON-SJOBECK, M. J.; FANGE, R. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. **Journal of Fish Biology**, London, v. 9, p. 425-440, 1976.

LAZZARI, R. et al. Hematologia de jundiás em resposta ao nível de proteína na dieta. **Ciência Rural**, v. 12, n. 2, 2011.

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

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-kow plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

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

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Aquicultura-Informações-Produção 2014**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/#aquicultura/informacoes/producao>>. Acesso em: 10 out. 2014.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **BOLETIM ESTATISTICO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011 e 2013, Brasília, 2012 e 2014.** Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>>. Acesso em: 10 out. 2014.

NIC´IFOROVIC´, 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.

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: ULBRA, p. 12-24, 2008.

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

SACCOL, E. M. H. et al. Addition of Lippia alba (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: An analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

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.

SHALABY, A. M.; KHATTAB, Y. A.; ABDEL RAHMAN, A. M. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 172-201, 2006.

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.

SLOWING BARILLAS, K. V. Estudio de la Actividad Antiinflamatoria de Diversas Especies de la Flora de Guatemala. **Facultad de Farmacia**, Memoria Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1992.

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.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia (ISSN 2179-5746)**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUZA, C. F. et al. *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 4, p. 707-714, 2015.

SPADA, P. K. W. D. S.; SILVA, C. O. Antioxidantes não enzimáticos. In: Salvador M.; Henriques J. A. **Radicais livres e a resposta ao estresse oxidativo**. Canoas, Ed. Ulbra, p. 204, 2004.

SUTILI, F. J. et al. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 95-100, 2015.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 1-5, 2005.

TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, p. 693-698, 2002.

VEECK, A. P. L. et al. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 955-960, 2013.

VEECK, A. P. L. et al. Estabilidade lipídica de filés de carpa húngara congelados tratados com extratos de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1113-1119, 2015.

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.

WELLS, R. M. G.; PANKHURST, N. W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 276-284, 1999.

ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Revista Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 69-77, 2000.

ZHENG, Z. L. et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3-4, p. 214-218, 2009.

**ANEXO A – IMAGEM DE EXEMPLAR DA PLANTA DE *Lippia alba* UTILIZADA NO EXPERIMENTO**



**ANEXO B – IMAGEM DAS FOLHAS DE *Lippia alba* UTILIZADAS NO EXPERIMENTO**



**ANEXO C – IMAGENS DO SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA UTILIZADO NO EXPERIMENTO**



## ANEXO D – NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

### MANUSCRIPT PREPARATIONS

#### 1. General information

JEB requires authors to submit their manuscripts online using the Bench>Press manuscript processing system. All manuscripts should adhere to the journal's terms of submission.

Authors are required to read our journal policies before preparing their manuscripts and to complete and submit our submission checklist with their manuscripts. This form asks authors to confirm that they have followed best practice guidelines regarding experimental subjects, data reporting and statistics. The checklist is based on the NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research and is intended to help ensure high standards for reporting and to aid reproducibility.

All pre-submission or general editorial queries should be directed to the Editorial Office.

#### 2. Manuscript length

The following table shows the maximum word count of the main text (excluding title page, summary, references and figure captions) and maximum number of display items (figures and tables) for different article types.

Article type	Maximum word count	Maximum no. of display items
Research Article	7000	10
Short Communications	2500	3
Methods & Techniques	2500	3
Review	7000	8
Commentary	4500	5

Articles exceeding the limits specified above will be returned to authors at submission.

#### 3. Preparing the text and tables

The information below relates to a standard Research Article. For all other article types, please refer to the style and layout guidelines provided on our article types page.

### **3.1 File formats**

For manuscript text and tables, our preferred file format is Microsoft Word .docx (or .doc). We also accept Pages (rtf format) and LaTeX.

Please include tables as part of the manuscript file. Tables must be editable and not embedded as an image.

If you are submitting a LaTeX file, please include any component files, such as .st (style file), .cls (class file) and .bib (bibliography file) in your file submission. Please note that LaTeX files will be converted to Microsoft Word files during the production process and that authors will be required to check the conversion of symbols and special characters carefully at the proofing stage.

For mathematical equations, our preferred file format is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) and LaTeX.

### **3.2. Article sections**

#### **3.2.1. Title page**

This section should include a title of 120 characters or less that clearly and concisely summarises your specific findings and avoids specialist abbreviations, a running title of 40 characters or less, the full names (including middle initials) and affiliations of all authors (including present addresses for authors who have moved), and the corresponding author's email address. Please note any cases where authors contributed equally to the work. Please also include 3-6 key words for indexing purposes (select key words that will make your manuscript easily searchable).

#### **3.2.2. Summary statement**

Provide a brief Summary Statement for use in emailed and online tables of content alerts. The text should be between 15 and 30 words, and should explain, without overstatement, why someone should read the article. Please do not simply repeat the title, and avoid unfamiliar terms and abbreviations, as the text should be comprehensible to non-experts. We reserve the right to edit the text.

#### **3.2.3. Abstract**

Provide a brief abstract of no more than 250 words for Research Articles (150 words for Short Communications and Methods & Techniques). This should succinctly and clearly introduce the topic of the paper, summarise the main findings and highlight the significance of

the data and main conclusions. The abstract is used by abstracting services without modification and is often read more frequently than the full paper and therefore needs to be comprehensible in its own right. Do not include subheadings or references, and avoid any non-standard abbreviations.

#### **3.2.4. Introduction**

This section should succinctly provide the background information that is required to set the results into their proper biological context. It should not contain subheadings.

#### **3.2.5. Materials and methods**

This section should include sufficient detail to understand and to replicate the experiments performed, in conjunction with cited references. It should be divided into sections, and should include subsections detailing reagents, animal models and statistical analysis. Provide names and locations (town, state, country) for ALL equipment and reagent suppliers. Give Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) for all experimental species. Reporting standards should follow those recommended in our journal policies and submission checklist.

#### **3.2.6. Results**

This section should describe the results of the experiments performed and should be broken up by subheadings to organise the findings presented and walk the reader through the results. Reproducibility of results must be included – see our submission checklist for further information. Please ensure that the distinction between new results and published findings/established facts is clear.

#### **3.2.7. Discussion**

This section should explain the significance of the results and should place them into the broader context of the current literature. The Discussion may contain subheadings to highlight important areas that are expanded on in the text.

#### **3.2.8. Acknowledgements**

This section should mention any individuals or groups that are not named as authors but have contributed to the research presented (e.g. in terms of reagents, time, expertise) or writing of the manuscript.

**3.2.9. Competing interests**

Include a statement to identify any potential influences that readers may need to know about when thinking about the implications of the presented research. For more specific information regarding the affiliations and associations that must be disclosed, please see our journal policies page. Authors without financial or competing interests should explicitly assert this and include the statement ‘No competing interests declared’.

**3.2.10. Author contributions**

An author is someone who has made significant and substantial contributions to a study. JEB requires that the independent contributions of each author are stated in the manuscript. Please refer to journal policies for further information on our authorship policies. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that ALL co-authors have checked and confirmed their contribution statement prior to manuscript submission.

**3.2.11. Funding**

Details of all funding sources must be provided. It is the responsibility of the corresponding author to provide the relevant funding information from ALL authors. Please provide the official funding agency name as listed on the Crossref Funder Registry, i.e. ‘National Institutes of Health’, not ‘NIH’, and all relevant grant numbers. If your Funder is not listed in the Registry, please provide the name in full.

Where individuals need to be specified for certain sources of funding, please add initials after the relevant agency or grant number. Please use the following format: This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789]. Where no specific funding has been provided for the research, please state ‘This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors’.

**3.2.12. Data availability**

Any datasets supporting your work should be made publicly available at the time of publication. Please provide details of repository name, accession numbers or other identifiers such as a doi and, where possible, include a hyperlink to the URL of the dataset. For more specific information regarding the types of data that must be disclosed, please see our journal policies page.

### **3.2.13. References**

All references cited in the text, tables and figure legends should be included in a single reference list at the end of the article. For specific information about reference formatting, please see the references section below.

### **3.2.14. Figure legends**

Figure legends should be listed at the end of the manuscript. The first sentence of the legend should summarise the figure and be in bold. Each figure legend should stand alone and should contain enough information to ensure that the figure is understandable without having to refer to the main text. Figure panels should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.), and each panel should be described in the legend. Any abbreviations not given in the main text should be defined. For further details on what should be included in figure legends, please refer to our submission checklist.

### **3.2.15. Appendices**

This optional section can be used for information that is critical to the manuscript but would interrupt the flow of the article and is not suitable for inclusion as supplementary information. It should be formatted according to normal journal style. All figures, tables and equations should be numbered separately from the main text as Fig. A1, Table A1, Eqn A1, etc. Please note that the text, figures and tables in an Appendix count towards the overall manuscript length.

## **3.3. Preparing the text**

### **3.3.1. General information**

Prepare manuscripts in English (either US or UK spelling is acceptable but be consistent within the manuscript). Your writing should be comprehensible to editors and reviewers, and your writing style should be concise and accessible. If English is not your first language, please consider using a language editing service prior to submission.

Ensure that the language in your manuscript is original and does not contain previously published passages of text (including those from your own publications) – see our journal policies for more details. All accepted manuscripts are routinely screened using plagiarism-detection software.

Use 1.5 line spacing and continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing.

Do not embed figures in the text.

Cite each figure, table and movie in the text in numerical order. Figure or table parts should be labelled with uppercase letters (A, B, C, etc.). Use the following format for citations: Fig. 1A,B or Figs 1, 2 or Table 1 or Movie 1.

If necessary, display equations should be cited using the following format: Eqn 1.

For supplementary figures, tables and equations, cite as Fig. S1, Table S1, Eqn S1.

Define abbreviations at first mention and include a List of Symbols and Abbreviations used.

For special characters not available on a standard keyboard (e.g. Greek characters, mathematical symbols), use the Symbol font or the 'Insert Symbol' function in Microsoft Word, where possible. For special characters that are not available via this route, please use MathType characters; do not use embedded images (e.g. GIF).

### 3.3.2. Units and nomenclature

Units of measurement should follow the SI system, e.g. ml s<sup>-1</sup> rather than ml/s. Guidance on using the SI convention can be found here. Type a space between a digit and a unit, e.g. 1 mm (except 1%, 1°C).

Use s.e.m. and s.d. for standard errors, etc.

Taxonomic nomenclature: the Latin names and taxonomic authority (e.g. Linnaeus) should be provided for all experimental species. All species names should be italicized.

Genetic nomenclature: gene names should be in italic type, but the protein product of a gene should be in Roman type. Genetic nomenclature should be in accordance with established conventions and should be approved by the relevant nomenclature curator if applicable. See below for some relevant links.

HGNC list of genome databases: <http://www.genenames.org/useful/all-links#ovgdb>

*Caenorhabditis elegans*: <http://www.wormbase.org>

*Dictyostelium*: <http://dictybase.org/>

Chicken: <http://birdgenenames.org/cgnc/guidelines>

*Drosophila*: <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>

Human: <http://www.genenames.org/about/guidelines>

Maize: [http://www.maizegdb.org/maize\\_nomenclature.php](http://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php)

Mouse: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/lists/lists.shtml>

*Saccharomyces cerevisiae*: <http://www.yeastgenome.org/>

*Schizosaccharomyces pombe*: <http://www.pombase.org/submit-data/gene-naming-guidelines>

*Xenopus*: <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>

*Zebrafish*: <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

### 3.3.3. References

#### 3.3.3.1. References in text

References in the text should be cited using the Harvard (name, date) referencing system.

Each reference cited in the text (including those cited in supplementary information) must be listed in the Reference list and vice versa: please check these carefully.

Literature citations in text are as follows.

One author – (Jones, 1995) or (Jones, 1995; Smith, 1996).

Two authors – (Jones and Kane, 1994) or (Jones and Kane, 1994; Smith, 1996).

More than two authors – (Jones et al., 1995) or (Jones et al., 1995a,b; Smith et al., 1994, 1995).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: list in Reference list and cite as (Jones et al., in press).

Manuscripts posted on preprint servers but not yet published: list in Reference list and cite as (Smith et al., 2016 preprint).

Citation of unpublished work: we discourage citation of unpublished data; if it is necessary, use the format (S. P. Jones, unpublished observations/data). Unpublished data cannot be included in the Reference list.

PhD theses: cite in the text but do not list in the Reference list; use the format (Arthur R. Goode, Title of thesis, PhD thesis, Institute, Year).

Website URLs: cite in the text but do not list in the Reference list; provide the URL and, if the website is frequently updated, the date that the site was accessed.

Personal communications (i.e. the unpublished observations of other scientists): when a person who is not an author on the paper is the source of unpublished data, those data should be cited as a personal communication using the format (full name, institution, personal communication). Personal communications should not be cited in the Reference list and will only be published when substantiated by written permission (e.g. email) from the scientist cited.

### 3.3.3.2. Reference List

References are listed in alphabetical order according to surname and initials of first author.

Use the following style:

#### *Journal*

**Rivera, A. R. V., Wyneken, J. and Blob, R. W.** (2011). Forelimb kinematics and motor patterns of swimming loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): are motor patterns conserved in the evolution of new locomotor strategies? *J. Exp. Biol.* **214**, 3314-3323.

#### *Book*

**Hochachka, P. W. and Somero, G. N.** (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.

#### *Book chapter*

**Feller, G.** (2008). Enzyme function at low temperatures in psychrophiles. In *Protein Adaptation in Extremophiles* (ed. K. S. Siddiqui and T. Thomas), pp. 35-69. New York: Nova Science Publishers, Inc.

#### *Preprint server*

**Baillie-Johnson, P., van den Brink, S. C., Balayo, T., Turner, D. A. and Martinez Arias, A.** (2014). Generation of aggregates of mouse ES cells that show symmetry breaking, polarisation and emergent collective behaviour in vitro. *bioRxiv* doi:10.1101/005215.

If there are more than 10 authors, use 'et al.' after the 10th author.

Within a group of papers with the same first author, list single author papers first, then papers with two authors, then et al. papers. If more than one reference exists for each type, arrange in date order. Use a and b for papers published in the same year.

'In press' citations must have been accepted for publication and the name of the journal or publisher included.

### 3.4. Preparing tables

Prepare tables in 'cell' format and include in the same file as the main text. Tables must be editable and not embedded as an image.

The title of the table should be a single sentence and should summarise the contents of the table. Details referring to one or more isolated item(s) in the table are best given in a table footnote. Units should be given in parentheses at the top of each column (do not repeat in the table).

### 3.5. Preparing display equations

Our preferred file format for equations is MathType. We also accept Equation Editor (Microsoft Word) or LaTeX.

Please number all display equations, consecutively. They should take the form:

$$\dot{Q} = \frac{-\kappa A_p [P]}{\mu T_p}, \quad (1).$$

Units should be defined in the text rather than included in the equation.

## 4. Preparing figures

### 4.1. General information

Figures should be numbered in a single series that reflects the order in which they are referred to in the text.

Figures should be prepared at the smallest size that will convey the essential scientific information; final figure size is at the discretion of the journal. For further information on how to arrange your figures to optimise viewing by reviewers and readers, download our figure layout guidelines.

At initial submission, you may submit a single PDF file containing all text and figures. Once an article has been accepted for publication, you are required to submit separate files for each figure (see below for file formats).

Figure legends should be included in the main text file and not in the figure file.

There are no charges for the use of colour in figures, although gratuitous use of colour in graphs and diagrams should be avoided and colour should only be used to improve scientific clarity.

### 4.2. Preparing graphs and diagrams (line art)

#### 4.2.1. General information

The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm × 210 mm.

Line thicknesses and symbols should be of sufficient size to ensure clarity if the figure is reduced in size.

For graphs, our preferred symbols are filled and open circles, triangles, squares, or diamonds; where possible, the same symbol should be used for the same entity in different figures.

Colour: supply line art in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.

Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

#### **4.2.2. File formats**

Authors should submit their source figures in an editable format (vector graphic) that retains font, line and shape information. This format ensures that we can edit where necessary and produce high-quality print and online PDFs.

**We accept the following file formats for graphs/line art: EPS, PDF, and WMF.**

Applications such as Adobe Illustrator, Canvas, DeltaGraph, Corel Draw, Freehand, MatLab and SigmaPlot provide these formats.

Please ensure that you 'export' or 'save' with (text/font) information included

Save text/font information as 'text' not 'curves' or 'outlines'.

If combining images, always 'embed' images; do NOT simply 'link' them. In Adobe Illustrator, copying and pasting or dragging an image directly from Adobe Photoshop will embed the image. Alternatively, if you use the 'Place' command, uncheck 'Link' in the dialogue box. For other software applications, please refer to the documentation (often there will be a 'link', 'proxy', 'OLE' or 'OPI' option, which must NOT be used with EPS files).

*Note that submission of JPEG or TIFF format for graphs/line art may delay production of your article.*

### **4.3. Preparing photographic images**

#### **4.3.1. General information**

Photographic images (also known as bitmap images) are made up of pixels (e.g. light, fluorescence and electron microscopy, gels, and traditional photography).

The maximum figure size, including lettering and labels, is 180 mm x 210 mm.

Images should be saved at a resolution of 300 pixels per inch. Any image quality option should be set to maximum.

For micrographs, use a scale bar to show the magnification and give the length of this in the figure legend.

Colour: supply images in RGB (not CMYK) mode, as this maximizes colour quality and is how the figures will be displayed online; do NOT use Spot, Pantone or Hex colours and do NOT assign a colour profile.

Text labelling: use 12 pt bold uppercase letters (A, B, C, etc.) to distinguish figure panels; other labelling should be 8 pt Arial font (sentence case) (headings should be bold); for gene sequences, use Courier font to ensure that each letter is the same width; use Symbol font for Greek characters.

#### **4.3.2. File formats**

Our preferred file format is JPEG.

JPEGs are small, can be uploaded quickly and produce small PDFs that are easy for reviewers to download; JPEG compresses the image in a way that retains the detail that matters most. If you are unable to provide your figures in JPEG format, we are also able to accept TIFF files; however, please note that TIFFs are very large (10-40 MB per image), slow to upload and can result in large PDFs that reviewers and readers are unable to download.

#### **4.4. Image manipulation**

Any alterations made to figures using computer software must be consistent with our image manipulation policy. The images presented in the manuscript must remain representative of the original data, and the corresponding author will be asked to confirm this at submission. Please read our requirements for preparing your figures (download PDF) to avoid a potential delay in the publication process or rejection on the basis of non-compliance with these guidelines.

All accepted manuscripts are routinely screened by our production department for any indication of image manipulation. If evidence of inappropriate manipulation is detected, the journal's Editors might ask for the original data to be supplied and, if necessary, may revoke the acceptance of the article.

#### **4.5. Figure permissions**

It is the responsibility of the author to obtain permission to use figures from another publication in any article submitted to JEB and to ensure that any such use is credited to the source. Any fees associated with use of the figure are the responsibility of the author. Written permission from the author and/or publisher of the original material, as appropriate, should be provided at the time of submission, otherwise publication may be delayed. If a figure has been

modified from a previously published figure, please check with the copyright owners to see whether permission is required and include a complete citation/reference for the original article.

## **5. Preparing movies**

Our preferred file format for movies is .mp4, but we also accept .mov

Please provide a separate text file containing the titles and captions of all movies. Please keep captions as short as possible and ensure that they explain what is being shown in the movie and any necessary details of how the movie was made.

Movies should be numbered in a single series that reflects the order in which they are cited in the text, e.g. see Movie 1. Movie 2, etc.

In the final online article, all movies are displayed in the supplementary information.

We have a limit of 10 MB for all movie and supplementary information files. If your movies exceed this limit, please contact the Editorial Office for advice before submission; we may be able to reduce the size of your movie files without losing resolution or discuss other options for hosting. For example, if you have movies that exceed our file limits and that are supplementary to the core message of the paper (or if you wish to provide readers with a higher-resolution version of the movie than can be displayed within our file size limits), we encourage you to deposit them in a reliable data repository such as Dryad or Figshare and link to them from the main paper - please see our guidelines on Data deposition for further information. Alternatively, we may consider hosting large movies that are central to the article on the journal's YouTube channel, again with a direct link from the main paper.

Please note that we reserve the right to make movies or other data forms available on an Open Access basis via The Company of Biologists' website, You Tube and other online channels. Where we do, the movies and other data forms may on occasion be made available under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC-BY) Licence. These terms permit the copying and/or adaptation of the movie and the distribution of the movie or any such adaptation by any means and in any medium or format to any other person, including for commercial purposes, provided that you are credited as the original author. There would be no additional cost to you, the author.

## 6. Supplementary information

### 6.1 General information

Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. Supplementary information provides access to supporting data that do not appear in the printed article or PDF but that accompany the final version of a paper online.

These data are peer reviewed and subject to the same criteria as the data that are to be published in the paper itself. During peer review, editors and reviewers are asked to assess whether supplementary information is appropriate and essential for supporting the findings of a paper.

All supplementary data will be strictly limited to a total of 10 MB per article.

We only accept data files - such as datasets, movies, audio, figures and tables - as supplementary information. We do NOT accept text files that provide additional materials and methods, results or discussions related to the article; these should be included in the article itself. Statistical and computational analyses should ideally be included in the methods section or as an appendix in the main article. Very large files or those requiring specialist software are not suitable as supplementary information. For large datasets, e.g. computational analyses, please see our guidelines on data deposition.

Criteria for each supplementary information type are listed in the table below. The total number of supplementary information items of all types (figures, tables, movies, etc.) per article should not exceed the total number of figures and tables in the main article.

<b>Data type</b>	<b>Criteria</b>	<b>Citation style</b>
Figures and tables	Max. of 6 items per article (should not exceed the total number of figures/tables in the main article)	Fig. S1, Fig. S2; Table S1, Table S2, etc.
Datasets	Include as supplementary tables	Table S1, Table S2, etc.
Movies and audio clips	Max. of 3 movies/audio per article	Movie S1, Movie S2, etc.; Audio S1, Audio S2, etc.

With the exception of movies and large tables (see sections on preparing movies and supplementary tables), all supplementary information should be collated into a single PDF file. For the convenience of readers, please number each figure/table and place next to the corresponding legend in the PDF.

Please note that supplementary information files are not copyedited by JEB and therefore authors must ensure that all files are checked carefully before submission and that the style of terms and figures conforms to that of the article. Modification of supplementary information after publication will require a formal correction.

Refer to each piece of supplementary information at least once within the text of the main article (the article that is published in the print issue of the journal).

## **6.2. Supplementary figures**

Figures in PDF, EPS, JPEG and TIFF format are acceptable - see guidelines on preparing figures for further information.

Number supplementary figures using the format Fig. S1, Fig. S2, etc. and include a legend for each figure. If a supplementary figure relates to a particular figure in the text, please cite it as close to this figure as possible. For the convenience of readers, please place each figure next to the corresponding legend in the supplementary information PDF.

## **6.3. Supplementary tables**

Tables should generally be submitted as a Microsoft Word (.docx) file. However, if your table is very large, or you wish readers to be able to export and/or manipulate the data, we would prefer you to submit it as a Microsoft Excel file. Please see our guidelines on preparing tables above for further information.

Number supplementary tables using the format Table S1, Table S2, etc. Use a separate numbering system from that used in the main article and include a title for each table.