



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE
TIMOL PARA CARPA CAPIM: EFEITOS
SOBRE DESEMPENHO, SISTEMA
ANTIOXIDANTE E METABOLISMO
ENERGÉTICO HEPÁTICO**

MONIQUE BERTICELLI MORSELLI

CHAPECÓ, 2019.

MONIQUE BERTICELLI MORSELLI

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE TIMOL PARA CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): EFEITOS SOBRE DESEMPENHO,
SISTEMA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO ENERGÉTICO
HEPÁTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Co-orientador: Aleksandro Schafer Da Silva

Chapecó, SC, Brasil

2019

Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

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

**SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE TIMOL PARA CARPA CAPIM
(*Ctenopharyngodon idella*): EFEITOS SOBRE DESEMPENHO,
SISTEMA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO ENERGÉTICO
HEPÁTICO**

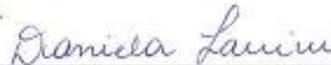
Elaborada por
Monique Berticelli Morselli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

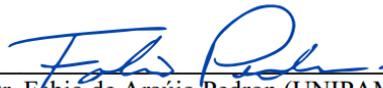
Comissão Examinadora:



Dr. Diogo Luiz de Alcântara Lopes – UDESC/Chapecó (Presidente)



Dra. Daniela Zanini (UFFS)



Dr. Fábio de Araújo Pedron (UNIPAMPA)

Chapecó, 20 de maio de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me manter em pé e nunca ter desistido de mim.

À minha mãe Maris, por ter deixado eu escolher meu caminho e sempre estar torcendo por mim.

À meu irmão Pedro Henrique, com seus abraços nas horas mais inesperadas.

À meu pai Renato, por me ensinar na prática o significado da palavra resiliência

Ao meu marido Francis, por estar sempre ao meu lado, me tirando da zona de conforto, me apoiando nas horas de desespero e pelo carinho e amor dedicado a mim.

À minha grande família por cultivar em mim a teimosia e festejar comigo o final desse ciclo.

A minha amiga Tais Zuffo, que sempre esteve presente nessa trajetória, me apoiando e me incentivando a não desistir, rindo das minhas louuras e sendo a pessoa mais transparente e amiga que alguém pode ter.

Aos colegas e amigos que fiz durante o mestrado, levarei todos pelo resto de minha vida.

Ao professor doutor Diogo, meu orientador, por aguentar todas os meus surtos, choros, desespero, felicidade e por ser uma pessoa de um coração enorme.

Ao professor doutor Aleksandro, meu co-orientador e anjo da guarda, pois esteve conosco até o último momento.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse projeto se concluísse, que meu ciclo no mestrado terminasse e que se alegrem com essa nova conquista.

Meu muito obrigada de todo o coração!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE TIMOL PARA CARPA CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*): EFEITOS SOBRE DESEMPENHO, SISTEMA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO

AUTOR: Monique Berticelli Morselli
ORIENTADOR: Diogo A Lopes
Chapecó, 20 de maio de 2019

O timol é um aditivo alimentar à base de plantas utilizado para melhorar o desempenho dos animais devido ao seu valioso potencial para melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo, a biodisponibilidade de nutrientes e o estado de saúde dos peixes. No entanto, os mecanismos exatos associados a isso permanecem pouco compreendidos. Recentemente, algumas evidências sugerem o envolvimento da rede de fosfotransferências e o status antioxidante. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a melhora do estado antioxidante/oxidante e da rede de transferência de fosforilação pode ser considerada como uma via envolvida no crescimento de carpas (*Ctenopharyngodon idella*) alimentado com diferentes níveis de timol dietético (100, 200 e 300 mg/kg de alimento). A dieta suplementada com timol (100 mg/kg de alimento) aumentou o peso corporal e o ganho de peso corporal 60 dias após a alimentação, em comparação com o grupo controle. As espécies de oxigênio reativo hepático (100 mg/kg de ração) e a peroxidação lipídica (100, 200 e 300 mg/kg de ração) foram menores nesses grupos em comparação ao grupo controle. As atividades de superóxido dismutase hepática (300 mg/kg de alimento) e glutathione peroxidase (100, 200 e 300 mg/kg de ração) e a capacidade antioxidante contra radicais peroxil (100 mg/kg de ração) foram maiores nesses grupos quando comparados ao grupo controle. Com base nessas evidências, 100 mg de timol/kg de suplementação dietética aumentaram o desempenho de crescimento de carpas de alevinos. Além disso, a suplementação dietética de timol (100 mg/kg de ração) foi capaz de melhorar o metabolismo energético hepático, enquanto praticamente todas as concentrações testadas de timol aumentaram o status antioxidante hepático, que pode ser envolvido no aumento do desempenho de crescimento de alevinos.

Palavras-chave: rede de transferência de fosforilação, aquicultura; desempenho de peixes; radicais livres.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

DIETARY SUPPLEMENTATION OF TIMOL FOR COMMON CARP CAPIM (*Ctenopharyngodon idella*): EFFECTS ON PERFORMANCE, ANTIOXIDANT SYSTEM AND HEPATIC ENERGY METABOLISM

AUTHOR: Monique Berticelli Morselli

ADVISER: Diogo A. Lopes

Chapecó, 20 de maio de 2019

Thymol is an herbal food additive used to improve animal performance due to its valuable potential to enhance productive and reproductive performance, bioavailability of nutrients and health status of fish. However, the exact mechanisms associated to that remains poorly understood. Recently, some evidences suggested the involvement of the phosphotransfer network and the antioxidant status. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the improvement of the antioxidant/oxidant status and the phosphoryl transfer network could be considered pathways involved on enhanced growth performance in grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed with different dietary thymol levels (100, 200 and 300 mg/kg feed). Thymol-supplemented diet (100 mg/kg feed) increased body weight and body weight gain 60 days post-feeding compared to the control group. Hepatic reactive oxygen species (100 mg/kg feed) and lipid peroxidation (100, 200 and 300 mg/kg feed) were lower in these groups compared to the control group. Hepatic superoxide dismutase (300 mg/kg feed) and glutathione peroxidase (100, 200 and 300 mg/kg feed) activities, and antioxidant capacity against peroxy radicals (100 mg/kg feed) were higher in these groups compared to the control group. Based on these evidences, 100 mg thymol/kg dietary supplementation increased growth performance of fingerlings grass carp. Moreover, thymol dietary supplementation (100 mg/kg feed) was able to improve the hepatic energy metabolism, while practically all tested concentrations of thymol enhanced the hepatic antioxidant status, which can be pathways involved on increased growth performance of fingerlings grass carp.

Keywords: phosphoryl transfer network, aquaculture; fish performance; free radicals.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Revisão bibliográfica11

CAPÍTULO II

Manuscrito I20

Considerações finais.....38

Anexo: CEUA.....51

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aquicultura e Piscicultura

O crescimento populacional e a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis, nas últimas décadas, elevou significativamente a demanda mundial por pescado (BRABO et. al., 2016). Diante disso, a aquicultura tem se mostrado como alternativa viável para continuar aumentando esta oferta nos próximos anos (FAO, 2014), uma vez que é a atividade agropecuária que mais cresce no Brasil e no mundo (SEBRAE, 2015).

Dos países com maior potencial de produção aquícola, o Brasil tem papel de destaque especialmente por possuir grandes reservatórios de águas/recursos hídricos, ter um clima favorável, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (SEAP, 2007), além da ocorrência natural de espécies aquáticas de interesse zootécnico (BRASIL, 2013). Porém, a produção aquícola nacional, se comparada aos maiores produtores mundiais como a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia, ainda apresenta números incipientes (FAO, 2014).

Segundo a estimativa da FAO (2016), até 2025 os países da América Latina, o Brasil terá o maior crescimento aquícola (104%), superando México (54,2%) e Argentina (53,9%). Segundo os levantamentos da Associação Brasileira da Piscicultura – Peixe BR (2019) no ano de 2016, o país produziu 640.510 toneladas de peixes; em 2017, passou para 691.700 toneladas; e, em 2018, atingiu 722.560 toneladas de pescado, com isso teve um crescimento de 4,5% sobre as 691.700 toneladas do ano anterior. O volume produzido pela piscicultura brasileira representa quase 70% de toda a aquicultura nacional, com 483,24 mil toneladas de peixes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), movimentando com esta atividade cerca de 5 bilhões de reais ao ano e gerando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (ACEB, 2014).

No Brasil, em 1999 o consumo per capita era de 6,15 kg/hab/ano passando para 11,17 kg/hab/ano, em 2011, um aumento de 81% (SEBRAE, 2015), em 2018 o consumo per capita de pescado não ultrapassou os 10 kg/hab/ano (PEIXE BR, 2019). Dentre os principais fatores que levaram a esse aumento, mesmo que pequeno, pode-se destacar o incentivo de consumo

pelas políticas públicas e, sobretudo, a busca de alimentos mais saudáveis (SEBRAE, 2015). Além disso o estímulo no aumento do consumo com marketing voltado ao consumidor, o aumento da competitividade das empresas e o fortalecimento da imagem do setor, são fatores que alavancaram o consumo de pescado (PEIXE BR, 2019). Desta forma, a aquicultura brasileira, em destaque a piscicultura de peixes de água doce, tem demonstrado muito potencial produtivo e pode tornar-se uma das mais importantes fontes de proteína animal.

A piscicultura ocupa o primeiro lugar, mundialmente, em produção comparando com as demais atividades da aquicultura (cultivo de moluscos, crustáceos) (FAO, 2014). No Brasil dados de 2019 apontam que em 2018 a região Sul atingiu 198.600 toneladas de peixe, representando 27,5% da produção nacional, com crescimento de 11,3% em relação a 2017; a região norte se mantém na segunda colocação, mesmo com redução no crescimento de 7%; o nordeste teve crescimento de 20,6% e em quarto colocado está a região sudeste com crescimento de 7,6% em relação a 2017, já a região Centro-Oeste perdeu 7,8% da produção em 2018 e fechou o ano com 112.490 toneladas (PEIXE BR, 2019). Os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo são os cinco maiores produtores de carpa, com destaque a região sul do Brasil aonde as carpas correspondem mais de 80% das 34.370 toneladas enquadradas no item Outras Espécies, em 2018 (PEIXE BR, 2019).

1.2.1. *Carpa capim - Ctenopharyngodon idella*

As carpas ocupam as três primeiras posições no ranking mundial (carpa chinesa, carpa prateada e carpa comum, respectivamente), porém a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), espécie alvo deste projeto, ocupa a 7ª posição (SEBRAE, 2015).

Segundo SEBRAE (2015) as espécies de peixes mais usadas para produção são: carpa, tilápias, salmão e bagre, estando a aquicultura mundial dominada pela produção de ciprinídeos (grupo das carpas), sendo esta a principal espécie cultivada no cenário mundial. As carpas já foram a espécie mais produzida no Brasil, mas atualmente ocupam a 4ª posição no ranking nacional de produção. Em 2007 a produção de carpa foi de 36.631,00 toneladas, em 2010 sua produção aumentou chegando a 94.579,00 toneladas, em 2018 sua produção chegou a 80% nos três estados da região do sul do Brasil (PEIXE BR, 2019).

Originária da Ásia, a carpa capim apresentam de grande rusticidade (EUROSTAT, 2009) e se adaptaram facilmente nas regiões sul e sudeste do Brasil, com capacidade de resistir a uma ampla faixa de temperatura e suportando baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (EPAGRI, 2007; MELLO e STIPP, 2001). São cultivadas normalmente em viveiros escavados, sendo um dos peixes mais produzidos em sistemas de cultivo semi-intensivo e extensivo no Brasil (SEBRAE, 2016).

Algumas espécies de carpa são usadas para ornamentação, outras como a Carpa Capim são usadas para controle de plantas aquáticas (SILVA et al., 2014). Por ser um animal muito rustico, tem alto grau de crescimento e com isso favorece o cultivo em consorciação com outros peixes (policultivo) e cultura agrícola, como o arroz. O crescimento das carpas capim pode ser afetado pelas baixas temperaturas (15°C), pois afeta diretamente a sua alimentação (MELLO e STIPP, 2001). De todo o grupo das carpas, as carpas espelho são mais resistentes ao frio, seu crescimento é mais rápido, porém são mais susceptíveis a doenças e precisam de mais cuidado no manejo (PÍPALOVÁ, 2002; PÍPALOVÁ, 2003).

Apesar da rustiquez, as carpas capim não estão livres de serem acometidas por doenças bacterianas, e isso pode ocorrer devido ao sistema de manejo intensivo, elevadas densidades de estocagem, fornecimento de ração em demasia, aumento de dejetos dos peixes elevando o nível de matéria orgânica e com isso aumentando a quantidade de bactérias no viveiro, prejudicando a qualidade de água e como consequência causando doenças (VADSTEIN, 1997). O uso indiscriminado de antibióticos para eliminar ou diminuir os problemas causados por doenças no sistema produtivo faz com que haja a seleção de linhagem de bactérias resistentes aumentando o risco de resistência cruzada, ou seja, quando essa resistência acomete bactérias associadas à população humana (FIGUEIREDO et al., 2008).

Para diminuir o risco a saúde humana e dos peixes, bem como aumentar seu bem-estar, vários estudos estão sendo realizados com produtos derivados de plantas como, por exemplo, óleos essenciais, que constituem uma promissora fonte de moléculas bioativas. Quando adicionados à alimentação dos peixes alguns benefícios são observados, como alteração na microbiota intestinal, ação antioxidantes, ação imunoestimulantes e podendo até ter função antimicrobianas (WU et al., 2007; ALY; MOHAMED, 2010).

1.3. Alimentação de peixes

Sabe-se que todos os animais, de modo geral, necessitam de bons nutrientes para desenvolver as funções fisiológicas básicas, e com os peixes não é diferente, para um bom crescimento, uma reprodução adequada e outras funções fisiológicas é imprescindível a ingestão de nutrientes adequados que são obtidos de duas formas: ou alimentos naturais disponíveis no meio ambiente ou fornecido em rações comerciais. Quando a produção ocorre em viveiros escavados e em sistema de produção intensivo e semi-intensivo, o alimento natural se torna escasso, e é de suma importância a suplementação com dietas balanceadas e completas, por isso é importante conhecer os hábitos alimentares da espécie alvo (ROTTA, 2003).

A maioria dos peixes produzidos comercialmente, em seus hábitos alimentares, são generalistas o que contribui para a ingestão, digestão e absorção de diferentes tipos de alimentos (natural ou industrializados), porém quando consomem um determinado tipo de alimento e esse torna-se escasso os peixes podem substituir por outro totalmente diferente, sendo mais fácil isso ocorrer em peixes onívoros (ROTTA, 2003), entretanto peixes carnívoros (dourado, surubi, traira, etc) aproveitam melhor alimentos de origem animal porque precisam de maior concentração de proteína na dieta, principalmente quando são criados em cativeiro (RIBEIRO et al., 2012).

A carpa capim é um peixe de hábito alimentar herbívoro, preferindo plantas aquáticas submersas sem fibras longas e tecidos sensíveis. São seletas e se alimentam principalmente as bordas das gramíneas aquáticas (GETTS et al., 2009; STANLEY et al., 1978). Sua alimentação pode ser fornecida de forma artificial através de ração com 30% de proteína digestível e 3000 kcal/kg por exemplo, sendo ideal o fornecimento da ração quatro vezes ao dia para melhor distribuição dos nutrientes essenciais ao metabolismo dos peixes (MARQUES et al., 2008). Segundo Camargol et al. (2006) para a recria de carpa capim deve-se ter maior atenção, pois para ter um ganho de peso e desenvolvimento adequado apenas a oferta de gramíneas não é suficiente, por isso é fundamental a suplementação com ração com quantidade de 1% do peso vivo a cada 2 dias.

Quando cultivadas em sistema intensivos ou semi-intensivos a exigências nutricionais da carpa capim só são atendidas com dietas artificiais completas, porém esse modo de cultivo

acarreta alta densidade de indivíduos e limita a qualidade da água, com isso, estão sujeitos a stress constante o que prejudica a taxa de crescimento e eficiência alimentar, podendo assim originar enfermidades oportunistas. Para diminuir as enfermidades oportunistas e ampliar a produção, os piscicultores começaram a usar promotores de crescimento e antibióticos, de forma indiscriminada resultando no desenvolvimento de bactérias resistentes (FULLER, 1989).

Como alternativa, os fitoterápicos ganham espaço na aquicultura, apresentando vantagens com menor potencial de toxicidade, muitas vias de administração, menor probabilidade de desenvolver resistência e menor o impacto ambiental já que são naturais, fortalecendo, assim, a qualidade do cultivo e diminuindo custo de produção (COIMBRA et al., 2006). Os óleos essenciais de plantas medicinais têm potencial para o combate de enfermidades em peixes, possuem baixo custo para sua utilização e seu uso apresenta benefícios econômicos e ambientais, disponibilizando ao consumidor um alimento de ótima qualidade (SCHALCH et al., 2015). Esses ingredientes vêm sendo usado como aditivos alimentares e estão apresentando resultados satisfatórios, desse modo, possibilitam a ampliação da produção e/ou melhoram o sistema imunológico dos animais (SANTOS et al., 2009).

1.3.1. Óleos essenciais: timol

Os óleos essenciais, como por exemplo o timol, são definidos como substâncias complexas voláteis, lipofílicas, aromáticas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais. Estes podem ser usados como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, bem como nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética (MILLEZI et al, 2014).

Na alimentação animal, principalmente em peixes, podemos citar os mecanismos de ação como estimulação na digestão, alteração da microbiota intestinal, aumento na digestibilidade, absorção de nutrientes, efeito antimicrobiano e melhora da imunidade (SANTOS et al., 2009).

O 2-isopropil-5-metilfenol (Figura 1), ou como é conhecido usualmente timol, é encontrado em diversas plantas aromáticas (NOSTRO & PAPALIA, 2012; BUTOLO, 2005) produtoras de óleos essenciais (OLIVEIRA et al, 2018), sendo sintetizado pela primeira vez

por Caspar Neumann em 1719 (FRIEDRICH, 2014). Em temperatura ambiente o timol é encontrado em forma de cristais (HOLLAND et al., 2014). A principal planta de onde o timol é extraído é o tomilho, sendo a planta inteira usada para extração. Suas propriedades mais conhecidas são estimulantes na digestão, antisséptico e antioxidante (BUTOLO, 2005). Essas propriedades podem favorecer o desempenho zootécnico das carpas, o que justifica a escolha do timol como um aditivo alimentar.

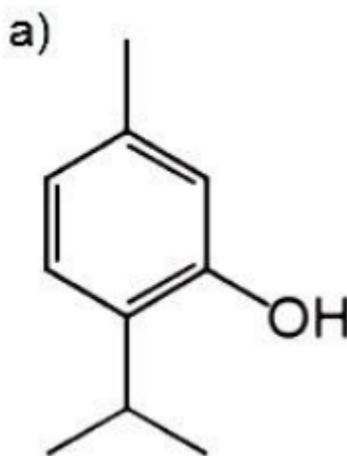


Figura 1: estrutura molecular do timol (Peixoto-Neves et al., 2010)

O timol possui atividade antibacteriana relacionada ao mecanismo de ação, que consiste em modificar a permeabilidade da membrana citoplasmática acarretando a saída do material intracelular e com isso causando a morte dos microrganismos (GARCIA-CARCIA et al., 2008). Vários estudos relatam a eficácia dos óleos essenciais, e destacaram o timol na atividade antibacteriana. Pozzo et al. (2010) em seu estudo com 33 isolados de *Staphylococcus spp* oriundos de rebanhos leiteiros caprinos identificaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais. Lima et al (2017) realizou um estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro e afirma que tanto o timol quanto o carvacrol exerceram atividade bacteriostática nas celas de *E. coli*. La Rosa (2011) demonstrou que os óleos essenciais têm atividade contra bactérias intestinais como *Escherichia sp.*, *Salmonella sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.* e *Klebsiella sp* com peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo). O timol na dieta pode ter um efeito antimicrobiano

que podem minimizar efeitos negativo de bactérias, e assim reduzirá a demanda energética direcionada para as respostas inflamatórias, disponibilizando mais energia para o ganho peso.

1.4. Metabolismo energético

O conjunto de reações químicas denominado metabolismo celular capacita os seres vivos a transformar e utilizar as energias obtidas do ambiente através do ATP (adenosina-5'-trifosfato) como intermediário transferidor de energia, sendo o ATP reconhecido pelo seu papel intracelular no metabolismo energético (NELSON & COX, 2008). Três enzimas importantes no processo de homeostase e manutenção dos tecidos regulando os níveis de ATP, que são elas Creatina Quinase (CK), Piruvato Quinase (PK) e Adenilato Quinase (AK) e cada uma delas possui uma função específica (DE FRANCESCHI et al. 2013; JANSEN et al. 2003).

A CK faz a homeostase energética de células com necessidade energética intermitente, como por exemplo o coração, sendo as doenças cardíacas relacionadas ao aumento ou diminuição dessa enzima (TOREN et al., 1994). A AK responsável pela interconversão de ATP, adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), ou seja, catalisa a reação de transferência de energia entre os nucleotídeos ATP, ADP e AMP (DZEJA e TERZIC, 1998). A PK é a enzima chave para o metabolismo celular, pois regula a rota glicolítica e catalisa a transferência de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para ADP formar piruvato e ATP (VALENTIN et al., 2000). O ATP está envolvido em vários processos biológicos diferentes, entre eles podemos citar transmissão nervosa, contração muscular (músculo cardíaco é um grande exemplo), coagulação sanguínea, dor, processos inflamatórios entre outros. E atualmente entende-se que o ATP e seus produtos de degradação ADP, AMP e adenosina constituem um conjunto de moléculas que agem como mensageiros das células agindo em vários tecidos e sistemas (BURNSTOCK., 2006).

Os nucleotídeos são moléculas sinalizadoras, pois encontram-se presentes em grandes concentrações no interior das células quando comparadas ao meio extracelular. Quando o organismo precisa responder a diferentes estímulos ou condições, como dano à membrana plasmática das células induzido por hipóxia, isquemia ou inflamação há liberação de ATP, pois concentrações crescentes de nucleotídeos podem ser liberadas no meio extracelular. O

ATP pode ser liberado, também, de células intactas por mecanismos fisiológicos, como por exemplo na transmissão nervosa. Assim que liberados no meio extracelular os nucleotídeos interagem com receptores específicos chamados de receptores purinérgicos estabelecendo comunicação “purinérgica” entre as células, sendo finalizada pela ação das enzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleotídeos no meio extracelular (BURNSTOCK, 2006 e BURNSTOCK., 2006)

Para a sobrevivência de uma célula normal é importante manter a homeostasia energética (FOO et al., 2012), porém para que ocorra a produção e consumo de ATP nas células é necessário que ocorra a interação de reações enzimáticas de trocas de grupos fosforil de alta energia com metabolismo energético mitocondrial. Para que isso ocorra é necessário que o ATP seja produzido e entregue nos locais de consumo (SEGAL et al., 2007; GLORIA-BOTTINI, et al., 2011). Nossa hipótese é que o timol como um aditivo funcional e estimulante, vai favorecer a síntese de ATP e consequentemente os peixes ganham peso corporal.

1.5. Sistema antioxidante

Em peixes a resposta ao estresse é algo que ocorre de forma interligada (BARTON, 2002), mas para melhor entendimento é separada em primária, secundária (LIMA et al., 2006) e terciária (SMALL, 2014; WEENDELAR BONGA, 1997; TORT, 2011), isto é, a) “primária” compreende a ativação dos centros cerebrais, com a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides (cortisol); b) “secundária” é a canalização das ações e dos efeitos imediatos dos hormônios envolvidos na fase primária em níveis sanguíneos e tecidos, com aumento significativo dos batimentos cardíacos e absorção de oxigênio, a mobilização de substrato e energia e a perturbação da osmorregulação; e c) “terciária” tem manifestação na população inibindo a reprodução, crescimento e resposta imune.

Para detectar o nível de estresse em peixes vários parâmetros são usados como por exemplo concentração plasmática de cortisol, catecolaminas, glicose, lactato, lipídios, eletrólitos, proteínas, creatinina, ureia e entre outros (DAVIS; PARKER, 1986; DAVIS;

SCHRECK, 1997; WENDELAAR BONGA, 1997). As catecolaminas e o cortisol, são liberados na fase secundária do estresse, e tem como consequência alterações bioquímicas no sangue e nos tecidos dos peixes, incluindo desequilíbrio eletrolítico, hiperglicemia, hiperlactatemia, diminuição nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres e colesterol (MCDONALD; MILLIGAN, 1997; WENDELAAR BONGA, 199; MILLIGAN, 2003).

A fonte primária de energia é a glicose, em peixes, suprindo a demanda do cérebro e dos músculos de forma principal. Em situação de estresse há um aumento da glicemia e se deve à ação das catecolaminas na quebra do glicogênio hepático (WENDELAAR BONGA, 2011), porém o lactato também pode ser usado como fonte glicogênica quando se encontra em maiores concentrações (MOMMSEN et al., 1999). Quando o animal se encontra em situação de estresse pode apresentar um aumento na mobilização de aminoácidos, vindos da quebra das proteínas, bem como alterações no metabolismo dos lipídios (WENDELAAR BONGA, 2011). O estresse também pode causar alterações nos parâmetros bioquímicos sanguíneos como níveis de enzimas e substâncias importantes da função metabólica (ureia e creatinina), que indicam a saúde geral dos peixes (CNAANI et al., 2004). Por isso é importante a avaliação bioquímica dos peixes quando se trata de estresse (BARTON, 2002).

Os radicais livres são produzidos por processos contínuos e fisiológicos e atuam como mediadores para transferência de elétrons nos processos metabólicos, possibilitando a formação de ATP, em proporções adequadas, através da cadeia transportadora de elétrons, mas a produção excessiva pode acarretar danos oxidativo (SHAMI e MOREIRA, 2004; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). São normalmente produzidos pelas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de radicais livres através da cadeia transportadora de elétrons (GREEN e BRAND, 2004).

O mecanismo de defesa antioxidante se desenvolve quando há produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, com objetivo de limitar os níveis intracelulares das espécies reativas e controlar a ocorrência de danos. (SHAMI e MOREIRA, 2004; BIANCHI e ANTUNES, 1999). Quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes há a instalação do processo de estresse oxidativo em favor da geração excessiva de radicais livre. Esse processo ocasiona a oxidação das moléculas e como consequência perda das funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (HALLIWELL e

WHITEMAN, 2004). Segundo Ferreira (2004) a produção de radicais livres desencadeia eventos patológicos.

O sistema antioxidante tem função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais, através de diferentes mecanismos como: impedir a formação de radicais livres ou espécie não-radicaais, como sistema de prevenção; impedir a ação desses ou favorecer o reparo e a reconstrução das estruturas biológicas lesada, como sistema de reparo (KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000). O sistema antioxidante é dividido em dois, enzimático e não-enzimático, sendo esse último composto por várias substâncias antioxidantes com origem endógena ou dietética (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Definiremos os antioxidantes como sendo substâncias que são capazes de atrasar ou inibir a oxidação de maneira eficaz, agindo como neutralizadores da ação dos radicais livres e espécie não-radicaais ou participando de sistema enzimático (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). O sistema de defesa enzimático é constituído por enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), sendo que as duas últimas agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio - que agem no mecanismo de prevenção impedindo/controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais e estão diretamente ligados na introdução das reações em cadeia que culmina a propagação e amplificação do processo com ocorrência de danos oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). As atividades enzimáticas muitas vezes dependem da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem alimentar (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), como por exemplo o timol.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suplementação de timol na dieta de carpa capim e seus efeito sobre desempenho zootécnico, o sistema antioxidante e metabolismo energético.

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a suplementação com timol para carpa capim melhora o desempenho zootécnico.
- Determinar a melhor dose para suplementação de timol.
- Avaliar se o timol na dieta das carpas é capaz de estimular o sistema antioxidante e assim reduzir os níveis de radicais livres.
- Avaliar se a suplementação com timol altera atividade de enzimas do metabolismo energético a nível hepático, e se essa mudança favorece a produção de ATP e consequentemente melhora desempenho.

2. CAPÍTULO II MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual foi submetido.

2.1 MANUSCRITO I

**Benefits of thymol dietary supplementation for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*):
improvement on performance, hepatic antioxidant system and energetic metabolism**

Autores: Monique B. Morselli, João H. Reis, Matheus D. Baldissera, Carine F. Souza,
Bernardo Baldisserotto, Tiago G. Petrolli, Diovani Paiano, Diogo L. A. Lopes, Aleksandro S.
Da Silva

De acordo com normas para publicação em:

Aquaculture Research

Benefits of thymol dietary supplementation for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): improvement on performance, and hepatic antioxidant system and energetic metabolism

Running Head: *Thymol supplementation for grass carp*

Monique B. Morselli^a, João H. Reis^a, Matheus D. Baldissera^b, Carine F. Souza^b,
Bernardo Baldisserotto^b, Tiago G. Petrolli^c, Diovani Paiano^a, Diogo L. A. Lopes^{a*},
Aleksandro S. Da Silva^{a*}

^a Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, RS, Brazil.

^b Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^c Graduate Program in Animal Health and Production in Small Farms, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, Brazil.

*Author for correspondence: A.S Da Silva (dasilva.aleksandro@gmail.com); D.L.A. Lopes (diogo.lopes@udesc.br)

ABSTRACT

Thymol is an herbal food additive used to improve animal performance due to its valuable potential to enhance productive and reproductive performance, bioavailability of nutrients and health status of fish. However, the exact mechanisms associated to that remains poorly understood. Recently, some evidences suggested the involvement of the phosphotransfer network and the antioxidant status. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the improvement of the antioxidant/oxidant status and the phosphoryl transfer network could be considered pathways involved on enhanced growth performance in grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed with different dietary thymol levels (100, 200 and 300 mg/kg feed). Thymol-supplemented diet (100 mg/kg feed) increased body weight and body weight gain 60 days post-feeding compared to the control group. Hepatic reactive oxygen species (100 mg/kg feed) and lipid peroxidation (100, 200 and 300 mg/kg feed) were lower in these groups compared to the control group. Hepatic superoxide dismutase (300 mg/kg feed) and glutathione peroxidase (100, 200 and 300 mg/kg feed) activities, and antioxidant capacity against peroxy radicals (100 mg/kg feed) were higher in these groups compared to the control group. Based on these evidences, 100 mg thymol/kg dietary supplementation increased growth performance of fingerlings grass carp. Moreover, thymol dietary supplementation (100 mg/kg feed) was able to improve the hepatic energy metabolism, while practically all tested concentrations of thymol enhanced the hepatic antioxidant status, which can be pathways involved on increased growth performance of fingerlings grass carp.

Keywords: phosphoryl transfer network, aquaculture; fish performance; ROS.

1. INTRODUCTION

Aquaculture is the fastest growing food production sector in the world with an average annual growth rate of 5.8 % during the period of 2000-2016, reaching 80 million tons of food fish in 2016 (FAO, 2018). This fast growing occurs because aquaculture is responsible for the supply of fish for human consumption, since fish and fishery products represent a source of proteins and essential micronutrients for human health (Marinho et al., 2013). To supply the demand, a number of antibiotics were used in animal diets as growth promoters in order to avoid disease, improve performance and increase intestinal microbial population (Bento et al., 2013). However, the emergence of bio-resistance along with the transmission of resistant microorganisms from animals to humans and the increasing demand for aquaculture more friendly to the environment, lead to a crescent search for natural growth promoters (Amer et al., 2018), such as thymol.

Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) is a natural monoterpene found in some essential oils extracted from plants, as thyme (*Thymus vulgaris*) (Hoseini and Yousefi, 2019) and oregano (*Origanum heracleoticum*) (Zheng et al., 2009), and has been successfully used in fish nutrition as an herbal feed additive to improve animal performance, activation of digestive system structure and function, enhancing the metabolism and reducing the damage of compounds/free radicals from interacting with cellular biological compounds (Ran et al., 2016; El-Hack et al., 2016; Aanyu et al., 2018). In this sense, a recent study conducted by Amer et al. (2018) revealed that the addition of 1 and 2 mL of thymol/kg of the diet was able to improve growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed during 75 days. Also, these authors revealed that thymol improved muscle antioxidant/oxidant status via reduction of lipid peroxidation and augmentation of glutathione reductase levels,

concluding that the improvement of antioxidant/oxidant status is a pathway associated to enhance fish performance. In this sense, some evidences have suggested that the improvement of antioxidant/oxidant status exerts beneficial effects on enzymes belonging to the phosphotransfer network, as adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) (Baldissera et al., 2019), two key enzymes of the energetic metabolism linked to the adenosine triphosphate (ATP)-production and utilization in tissues with high and fluctuating energy requirements, as the liver tissue (Dzeja and Terzic, 2003).

The phosphoryl transfer network develops an essential role on energy transfer and distribution, as well as on securing the cellular economy by the maintenance of the balance between ATP consumption and production (Dzeja and Terzic, 2003). The PK is an irreversible enzyme of glycolysis pathway that forms pyruvate and ATP, exerting a fundamental role to suitable energy production in tissues with high demand of energy (Wang et al., 2002). Also, AK exerts a role maintaining the bioenergetic balance via reconverting two adenosine diphosphate (ADP) molecules into one ATP and one adenosine monophosphate (AMP), which provides the doubling of energetic potential, a crucial step for the improvement of the intracellular energetic communication and metabolic monitoring in tissues with high and fluctuating demands of energy (Dzeja and Terzic, 2009). Recently, a study conducted by Baldissera et al. (2019) demonstrated that the reduction of hepatic lipid peroxidation and the increase on total antioxidant capacity caused an augmentation on hepatic PK activity, which directly contributed to improve growth performance of Nile tilapia fed with a diet containing vegetable choline. Thus, our hypothesis is that the improvement of the hepatic antioxidant/oxidant elicited by thymol supplementation can enhance the phosphoryl transfer network, which can consequently, exert beneficial effect on fish performance.

Based on these evidences, the aim of the present study was to evaluate whether the improvement of antioxidant/oxidant status and phosphoryl transfer network could be considered pathways positively involved on growth performance of grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed with different levels of dietary thymol.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Thymol and diet preparation

Thymol (molecular weight: 150.22 g/mol) was purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil) for further addition on fish feed. A basal diet was based mainly of corn, poultry viscera meal, feather meal, and soybean meal, which was crushed and mixed with other ingredients (Table 1), providing all nutritional requirements for grass carp. In order to prepare a supplemented diet, inclusion of thymol (0.0, 100, 200 and 300 mg/kg of feed) was performed after preparation of the basal diet. Thymol was included in the feed after the extrusion process, which was offered to the fish in the slurry form.

2.2 Fish rearing, maintenance and water quality parameters

Healthy fish were maintained for 10 days in 250 L fiberglass tanks with continuous aeration under controlled water variables in freshwater. Dissolved oxygen and temperature were evaluated with an oxygen meter (Model Y5512, YSI, Ohio, USA), while the pH was measured using a DMPH-2 pH meter (Digimed, SP, Brazil). Total ammonia levels were determined according to Verdouw et al. (1978) and un-ionized ammonia (NH₃) levels were calculated using a conversion table for freshwater. The water parameters were monitored during the adaptation period (tank: 250 L) and during the experiment in the 16 tank tests.

These water parameters remained stable throughout all acclimation period: temperature (23.1 ± 0.2 °C), pH (6.9 ± 0.4), dissolved oxygen (6.8 ± 0.2 mg/L), total ammonia (0.81 ± 0.03 mg/L), and non-ionized ammonia (0.0041 ± 0.00028 mg/L).

2.3. Experimental design

A total of 160 fingerlings *C. idella* (7.33 ± 0.12 g; 8.13 ± 0.12 cm) were maintained in a recirculating aquaculture system and divided into four groups in quadruplicate with 10 fish per aquarium (60 L) as follows: the group T0 (basal diet without thymol supplementation), T100 (basal diet supplemented with 100 mg thymol/kg of basal feed), T200 (basal diet supplemented with 200 mg thymol/kg as fed basis), and T300 (basal diet supplemented with 300 mg thymol/kg as fed basis), following the protocol established by Ran et al. (2016). Fish were fed on one of the tested diets at feeding rate of 6 % of total biomass for 60 consecutive days. The feed protocol was divided into two equal portions and offered to fish twice a day at 9:00 am and 17:00 h. On day 60 post-feeding (PF), all animals were weighed: Fish body weight, total body length, weight gain and added body length were calculated for the total period (60 days).

2.4 Sample collection and tissue preparation

On day 61 PF, two fingerlings from each aquarium ($n = 8$ per treatment) were collected using natural anesthetic (eugenol 150 mg/L) (Ribeiro et al., 2015), followed by spinal cord section according to the Ethics Committee recommendations. Thereafter, the liver was removed and dissected in a glass dish over ice to evaluate the several parameters.

To evaluate enzymes belonging to the phosphoryl transfer network, the liver tissue was washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in the same SET buffer with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Part of these supernatants was used to evaluate all parameters (except PK activity). To measure hepatic PK activity, cell pellets after centrifugation were discarded and the supernatants were once again centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatants were stored for no more than 2 weeks at -80 °C.

2.5 Hepatic antioxidant/oxidant parameters

Hepatic reactive oxygen species (ROS) levels were determined by the DCFH oxidation method described by LeBel et al. (1992) as recently published in details by Souza et al. (2018) using excitation and emission wavelengths of 485 and 538 nm, respectively, and results were expressed as U DCF per mg of protein. Lipid peroxidation (LOOH) levels were measured as proposed by Montserrat et al. (2003) and reported in details by Souza et al. (2018), and the results were expressed as μmol CHP per g of tissue.

Hepatic SOD activity was evaluated spectrophotometrically as described by Marklund and Marklund (1974), recently published in detail by Souza et al. (2018), and the enzymatic activity was expressed as SOD units per mg of protein. Hepatic glutathione S-transferase (GST) activity was measured based on the method described by Habig et al. (1974) and reported in details by Biazus et al. (2017). Enzymatic activity was expressed as U GST per mg of protein. Hepatic glutathione peroxidase (GPx) activity was measured according to the methodology described by Paglia and Valentine (1967), as reported in detail by Souza et al. (2018). Enzymatic activity was expressed as

U GPx per mg of protein. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) levels was measured according to the protocol established by Amado et al. (2009) and reported in details by Souza et al. (2018) using wavelengths of 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) for 40 min at 37 °C. The results were expressed as fluorescence units per mg of protein.

2.6 Hepatic AK, PK and LDH activities

Hepatic AK activity was measured with a coupled enzyme assay using hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al. (1999) and published in detail by Baldissera et al. (2019). Hepatic PK activity was assayed according to the protocol established by Leong et al. (1981) and published in detail by Baldissera et al. (2019). The activity was expressed in μmol pyruvate formed per min per mg of protein. The activity was expressed in μmol ATP formed/min/mg of protein. Hepatic lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured spectrophotometrically at 340 nm as described by Kaplan et al. (1998) and published in details by Baldissera et al. (2019). The activity was expressed in μmol lactate oxidized per min per mg of protein.

2.7 Protein determination

Protein content in liver homogenates was determined by the method of Coomassie blue G dye (Read and Northcote 1981), using serum bovine albumin as the standard.

2.8 Statistical analyses

Normality and homoscedasticity were analyzed through the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. Therefore, statistical analysis was performed using bilateral

one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc analysis. Results were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical manipulations were performed using R-language, v.3.1 (R Development Core Team 2012). For performance data regression analysis was performed.

3. RESULTS

3.1 Growth performance

No significant difference was observed between groups regarding length and feed consumption. However, body weight and body weight gain were higher in group T100 compared to all others groups (Table 2). In percentage, the body weight of the fish in 60 days increased 8.7% (T0), 47.1% (T100), 10.9% (T200) and 15.4% (T300). Regression analysis showed a treatment effect on body weight and weight gain when the recommended dose of 68.4 mg/kg and 72.6 mg/kg thymol were used, respectively (Table 1).

3.2 Hepatic antioxidant/oxidant parameters

Hepatic LDH activity was lower in group T100 than on group T0. Hepatic ROS levels were lower in groups T100, T200 and T300 than those of T0, while hepatic LPO levels were lower only in the group T100 (Figure 1). Hepatic SOD activity was higher in group T300 than those of T0, while hepatic GPx activity was higher in groups T100, T200 and T300 than those of T0. Also, hepatic ACAP levels were higher in group T100 than group T0 (Figure 2).

3.3 Hepatic AK, PK and LDH activities

Hepatic AK activity was higher in group T100 than on group T0. No significant difference was observed between groups regarding hepatic PK activity (Figure 3).

4. DISCUSSION

The performance results of these fish were atypical; but the authors do not know how to explain the reason, since the conditions of the water were adequate for the grass carp, just as the feed had good quality (42% crude protein). One possible explanation for the low performance is that carp-grass are hardly fed with only feed, since they are herbivorous and filtering in the fry phase. This study demonstrated that thymol dietary supplementation (100 mg/kg of feed) was able to improve grass carp performance, and the recommended dose, statistically, was of 68.4 mg/kg and 72.6 mg/kg thymol to body weight and weight gain, respectively. These results were also observed in other fish species, such as Nile tilapia when fed with 1 and 2 mL thymol/kg of feed (Amer et al., 2018). The most important data is that thymol dietary supplementation exerted ameliorative effect on the hepatic antioxidant/oxidant status and the energetic metabolism, which can be involved in the improvement of grass carp growth performance.

After 60 days, grass carp that received 100 mg thymol/kg of feed showed an augmentation on body weight and body weight gain. These results are in agreement to Amer et al. (2018), who reported that the use of 1 and 2 mL thymol/kg of feed could satisfy all nutritional requirements of Nile tilapia fingerlings and enhanced body weight, body weight gain and feed intake in all observed periods (days 0-15, 16-30, 31-45, and 45-60). Our result corroborates with Ahmadifaret al. (2011), who stated that supplementing the diet with thymol-carvacrol powder from *O. vulgare* significantly improved growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Moreover,

Zheng et al. (2009) also reported that a mixture of thymol, carvacrol and oregano oil could improve body weight gain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), revealing that the use of essential oils containing thymol as the main compound can also be an alternative to improve fish growth performance. In disagreement with our observations, Giannenas et al. (2012) revealed that 6 g thymol/kg of feed was unable to improve the body weight and body weight gain of *O. mykiss* fed for 56 days. Similarly, Aanyu et al. (2018) demonstrated that 250 and 500 ppm of thymol for 63 days was unable to enhance body weight and body weight gain of juvenile Nile tilapia. Although several evidences have demonstrated the beneficial effects of thymol supplementation linked to growth performance, the exact pathways involved in this effect remain poorly understood. According to Amer et al. (2018), the enhancement on Nile tilapia fingerlings growth performance is attributed to enhanced immune and anti-inflammatory responses, as well as on muscle antioxidant defense system. However, it is important to emphasize that studies conducted by Giannenas et al. (2012) and Aanyu et al. (2018) observed a better immune response and antioxidant capacity without improvement of performance, i.e., these pathways did not contribute to enhance fish performance. Thus, 100 mg thymol/kg of feed supplementation can be considered as an interesting approach to improve growth performance of fingerlings grass carp.

Some evidences have suggested the involvement of improved energy metabolism with increased growth performance, as observed by Baldissera et al. (2019) while studying the dietary supplementation with vegetal choline. In the current study, we observed that 100 mg thymol/kg of feed was able to increase hepatic AK activity, indicating an attempt to double the energetic potential via reconverting two ADP molecules into one ATP and one AMP, which contributes to improve intracellular energetic communication and metabolic monitoring in tissues with high and fluctuating

energy demands, as the liver. Although the hepatic AK activity did not differ between groups, Baldissera et al. (2019) revealed that supplementations with 800 and 1200 mg vegetal choline/kg of feed were able to augment other important enzyme of phosphoryl transfer network, as hepatic PK, indicating an augmentation on production of pyruvate and ATP in liver tissue, which can contribute to improve energy transfer and distribution, as well as the balance between cellular adenosine triphosphate (ATP) consumption and production. It is important to emphasize that decrease on hepatic LDH activity is a consequence of hepatic energetic metabolism improvement elicited by increased AK activity, indicating that the anaerobic metabolism was not necessary to provide the sufficient energy to meet the energy requirements to suitable physiological functions of fingerlings grass carp, which can contribute to enhanced fish growth performance and health, as observed by Yousefi et al. (2018). Thus, the increase on hepatic AK activity, as well as the inhibition on hepatic LDH activity can be a pathway linked with improved growth performance in fingerlings grass carp supplemented with 100 mg VC/kg of feed.

In order to explain the ameliorative effects on AK activity, we decided to evaluate several oxidative-stress related parameters, since this enzyme is susceptible to inactivation by free radicals and oxidative damage. As expected, all thymol concentrations were able to reduce the hepatic ROS production, while 100 mg thymol/kg of feed reduced lipid peroxidation, in agreement to Amer et al. (2018). According to these authors, 1 and 2 mL thymol/kg of feed decreased lipid peroxidation in the muscle of Nile tilapia, which contributed to ameliorate the antioxidant status. Also, it is important to emphasize that a decrease on lipid peroxidation can be a direct consequence on reduced ROS levels, since it is the major pro-oxidant free radical linked with lipid peroxidation (Kwiecien et al., 2014). In our present study, the dietary

supplementation with thymol was able to enhance the hepatic antioxidant defense system, as observed by the increase on hepatic SOD (400 mg thymol/kg of feed) and GPx (all concentrations) activities, as well by increased ACAP (100 mg thymol/kg of feed) levels. In agreement to our observations, Amer et al. (2018) revealed that 1 and 2 ml thymol/kg of feed exerted ameliorative effects on antioxidant status via augmentation on muscle glutathione reductase levels and catalase activity, which contributed to increase fish growth and health. Similarly, Hoseini and Yousefi (2018) revealed that the use of thyme extract (5, 10 and 15 %), where the thymol is the main component, elicited a reduction on lipid peroxidation with concomitant increase on SOD and GPx activities in the gut of *O. mykiss* after 14 days of supplementation. Moreover, it is important to note that the improvement of antioxidant system can be a pathway associated to elevated AK activity, since the ameliorative antioxidant system is required for suitable functioning of phosphoryl transfer network (Grins et al., 2018). In this sense, a study conducted by Baldissera et al. (2019) revealed that augmentation on hepatic PK activity is a consequence of a reduction on hepatic ROS and LPO levels, which contributed to enhance growth performance of Nile tilapia fed with 800 and 1200 mg vegetal choline/kg feed. Thus, the improvement on hepatic antioxidant status can be a pathway linked with the improvement on AK activity and a consequent increase on the grass carp performance.

Based on these evidence, 72.6 mg thymol/kg dietary supplementation tested in the present study increased the weight gain of fingerlings grass carp. Moreover, thymol dietary supplementation (100 mg/kg feed) was able to improve the hepatic energy metabolism, while practically all thymol tested concentrations enhanced the hepatic antioxidant status, which can be pathways involved in the increase of growth performance of fingerlings grass carp. However, it is important to note that, according

to the statistical analysis, that even lower doses of thymol may potentiate the performance of carp.

Ethics Committee: These experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the State University of Santa Catarina (UDESC) under protocol number 8817050418.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgment

Thanks to CAPES and CNPq for the financial support: scholarship and research (PQ).

Statement: Expects Data

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

Ahmadifar E, Falahatkar B, Akrami R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Applied Ichthyology 27, 1057-1060.

- Amado L.L., Garcia M.L., Ramos P.B., Freitas R.F., et al. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.
- Amer SA, Metwally AE, Ahmed SAA. (2018). The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 44, 251-256.
- Anyu M, Betancor MB, Monroig O. (2018). Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 488, 217-226.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Baldisserotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, T.G., Da Silva, A.S. (2019). Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 501, 224-229.
- Bento, M.H.L., Ouwehand, A.C., Tiihonen, K., Lahtinen S, Nurminen S, Saarinen MT, Schulze H, Mygind T, Fischer J. (2013). Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals - Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Veterinárni Medicina* 58, 449-458.
- Biazus, A.H., Da Silva, A.S., Bottari, N.B., Baldissera, M.D., do Carmo, G.M., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Casagrande, R., Guarda, N.S., Moresco RN, Stefani LM, Campigotto G, Boiago MM. 2017. Fowl typhoid in laying hens cause hepatic oxidative stress. *Microbial Pathogenesis* 103, 162-166.
- Brazilian Compendium of Animal Feeding (2005). analytical methods. 2nd ed. São Paulo: ANFAR. 204p.

- Dzeja P.P., Terzic A. (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *The Journal of Experimental Biology* 206, 2039-2047. <https://doi.org/10.1242/jeb.00426>.
- Dzeja, P., Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1729-1772.
- Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., et al. (1999). Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ. Res.* 84, 1137–1143.
- El-Hack, M.E.A., Alagawany, M., Farag, M.R., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Zorriehzahra, J., Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research* 28, 365-382.
- Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., Karagouni E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350-353, 26-32.
- FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the Sustainable Development Goals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hoseini, S.M., Yousefi, M. (2019). Beneficial effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on oxytetracycline-induced stress response, immunosuppression, oxidative

- stress and enzymatic changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
Aquaculture Nutrition 25, 298-309.
- Kaplan, A., Szabo, L. L., Opheim, K. E. (1998). Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. Lea e Febiger, Philadelphia.
- Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwoeski, S., Pajdo, R., Brzozowski, B.,
Match T, Wojcik D, Brzozowski T. (2014). Lipid peroxidation, reactive oxygen
species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions
and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. J.
Physiol. Pharmacol. 65, 613-622.
- Leong, S.F., Lai, J.C., Lim, L., Clark, J.B. (1981). Energy-metabolizing enzymes in
brain regions of adult and aging rats. J. Neurochem. 37, 1548–1556.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-
dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and
oxidative stress. Chem. Res. Toxicol. 5: 227–231.
- Marklund, S., Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the
autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur.
J. Biochem. 47, 469–474.
- Marinho, R.G.B., Tavares-Dias, M., Dias-Grigório, M.K.R., Neves, L.R., Yoshioka,
E.T.O., Boijink, C.L., Takemoto, R.M. (2013). Helminthes and protozoan of
farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite
relationship. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 65, 1192–1202.
- Montserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho G.L.L., Vinagre V.M., et al. (2003).
Determination of lipid peroxides in invertebrates using the Fe (III) xyleneol orange
complex formation, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45 177–183.

- Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169.
- Ran, C., Hu, J., Liu, W., Liu, Z., He, S., Truc, Dan BC, Diem NN, Ooi EL, Zhou Z. (2016). Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an intestinal microbiota-mediated effect: Insights from a germ-free zebrafish model. *Journal of Nutrition* 146, 1132-1140.
- Read, S.M., Northcote D.H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 116: 53-64.
- Ribeiro, P.A.P., Miranda-Filho, C., De Melo, D.C., Luz, R.K. (2015). Efficiency of eugenol as anesthetic for the early life stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 87, 529-535.
- Souza, C.F, Baldissera, M.D., Descovi S.N., Zeppenfeld C.C., et al. (2018). Serum and hepatic oxidative damage induced by a diet contaminated with fungal mycotoxin in freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*: Involvement on disease pathogenesis. *Microbial Pathogenesis* 124, 82-88.
- Verdouw, H., Vanechteld, C.J.A., Deckkers, E.M.J. (1978). Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research* 12, 399–402.
- Wang, H., Chu, W., Das, S.K., Ren, Q., (2002). Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Northern European Caucasians. *Diabetes* 51, 2861-2865.
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X., Wang, K.Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth,

antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 292, 214-218.

Table 1: Centesimal, calculated and analyzed compositions of fish diet without thymol.

Ingredients	g/kg
Ground corn	320.0
Poultry viscera meal	280.1
Feather meal	280.0
Soybean meal ¹	74.4
Limestone	40.0
Vitamins and Minerals premix ²	4.00
Antifungal	1.00
Antioxidant	0.50
Calculated composition	
Dry matter, %	90.6
Crude protein, %	42.0
Digestible energy, Mcal/kg	3.25
Calcium, %	2.77
Non-phytate phosphorus, %	0.98
Sodium, %	0.19
Neutral detergent fiber	4.79
Acid detergent fiber	1.74

¹Product with 46% of crude protein; Cooperalfa, Brazil; ²1 kg of vitamins and minerals premix provided the minimum of: Calcium 166 g; copper 357 mg; chrome 9.4 mg; iron 2.34 g, phosphorus 35 g; carnitine 1041.6 mg; phytase 11666 FTU; lysine 46.67 g; manganese 1.17 g; selenium 10.5 mg; sodium 40.8 g; zinc 2.81 g); folicacid 93.70 mg; pantothenic acid 468 mg; biotin 10.55 mg; choline 12.50 g; niacin 703 mg; vitamin A 233000 UI; vitamin B12 703 µg; vitamin B2 117 mg; vitamin B6 70 mg; vitamin D3 46600 UI, vitamin E 1288 UI; vitamin K3 58 mg; methionine 11.57 g; threonine 35 g; tryptophan 5.83 g; valine 23.33 g; *Bacillus licheniformis* 13.33 x 10⁶ UFC; and *B. subtilis* 13.33 x 10⁶ UFC.

1 **Table 2:** Performance of *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*) fed with different levels of thymol in the diet for 60 days

	Starter values		Values at 60 days				
Level	Initial body weight, g	Initial total length, mm	Feed intake, g	Body weight ^{&} 60, g	Weight gain ^{&} , g	Total length, mm	Length gain, mm
0	7.52	8.00	28.25	8.18 ^b	0.66 ^b	10.25	2.25
100	7.27	8.16	31.65	10.70 ^a	3.43 ^a	11.78	3.65
200	7.24	8.225	27.37	8.03 ^b	0.79 ^b	10.58	2.35
300	7.30	8.20	28.33	8.43 ^b	1.12 ^b	10.58	2.37
Qualitative statistical analysis							
p=	0.704	0.714	0.164	0.002	0.006	0.230	0.143
CV	11.46	6.63	9.15	9.63	66.30	9.69	33.88
Quantitative regression analysis							
Linear model	0.704	0.542	0.552	0.542	0.714	0.922	0.695
Quadratic model	0.866	0.802	0.612	0.254	0.247	0.417	0.383
Square root model	0.707	0.653	0.328	0.042	0.044	0.209	0.166
Equation parameters for "Square root" model*							
a				8.261	0.742		
b				0.440	0.484		
c				-0.027	-0.028		
R2				0.387	0.383		
Maximum point				68.35	72.61		

2 *Dependent variables = $a + b \cdot \text{Level}^{(1/2)} + c \cdot \text{Level}$.3 EX: *Body weight 60 days (g) = $8.261 + 0.440 \cdot \text{level}^{(1/2)} - 0.027 \cdot \text{Level}$, (R2=38.7) and maximum point 68.35 mg/kg; Weight gain (g) = $0.742 + 0.484 \cdot \text{level}^{(1/2)} - 0.028 \cdot \text{Level}$, (R2 38.3) and maximum point 72.61 mg/kg.4 &For body weight and weight gain the difference between groups was illustrated by different letters in the same column (^a and ^b).

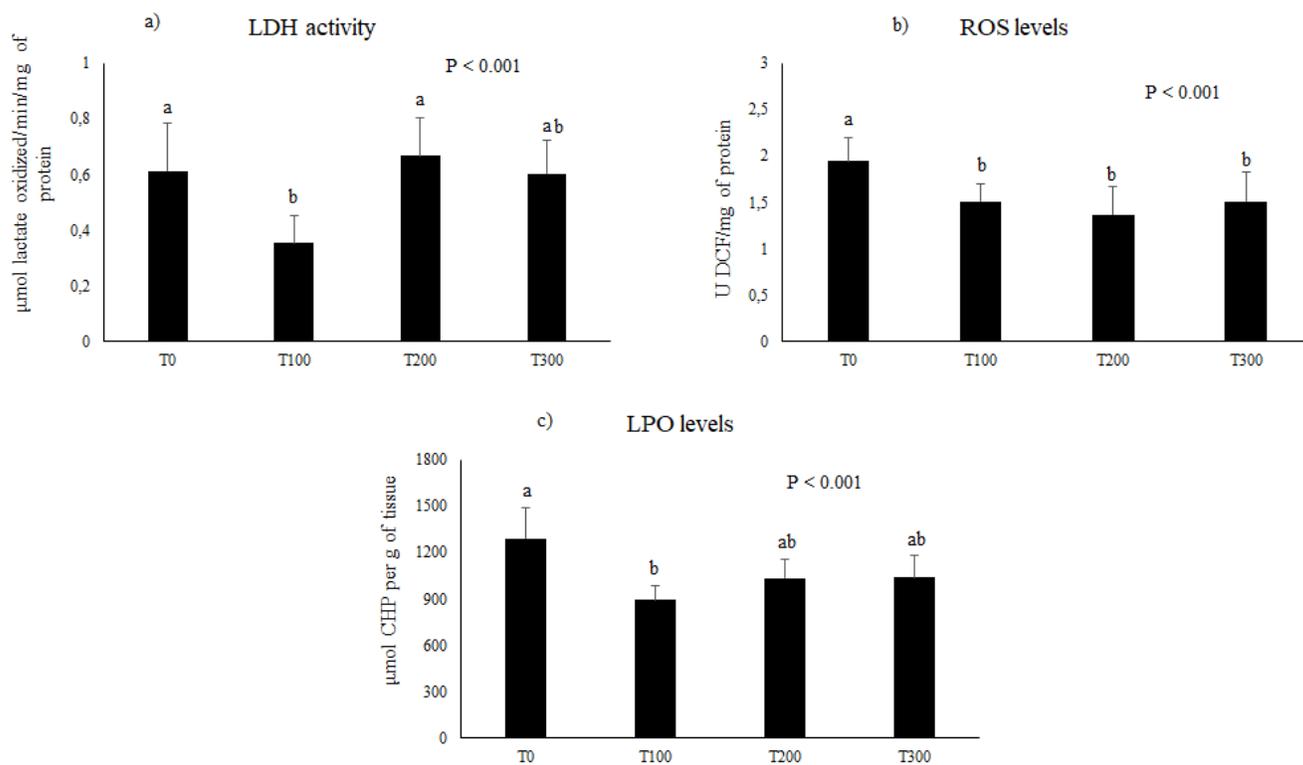


Figure 1: Hepatic and lactate dehydrogenase (LDH) activities [A], reactive oxygen species (ROS) [B] and lipid peroxidation (LPO) [C] levels of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with different thymol levels for 60 days. Bars with different letters indicate significant difference between groups at $p < 0.05$

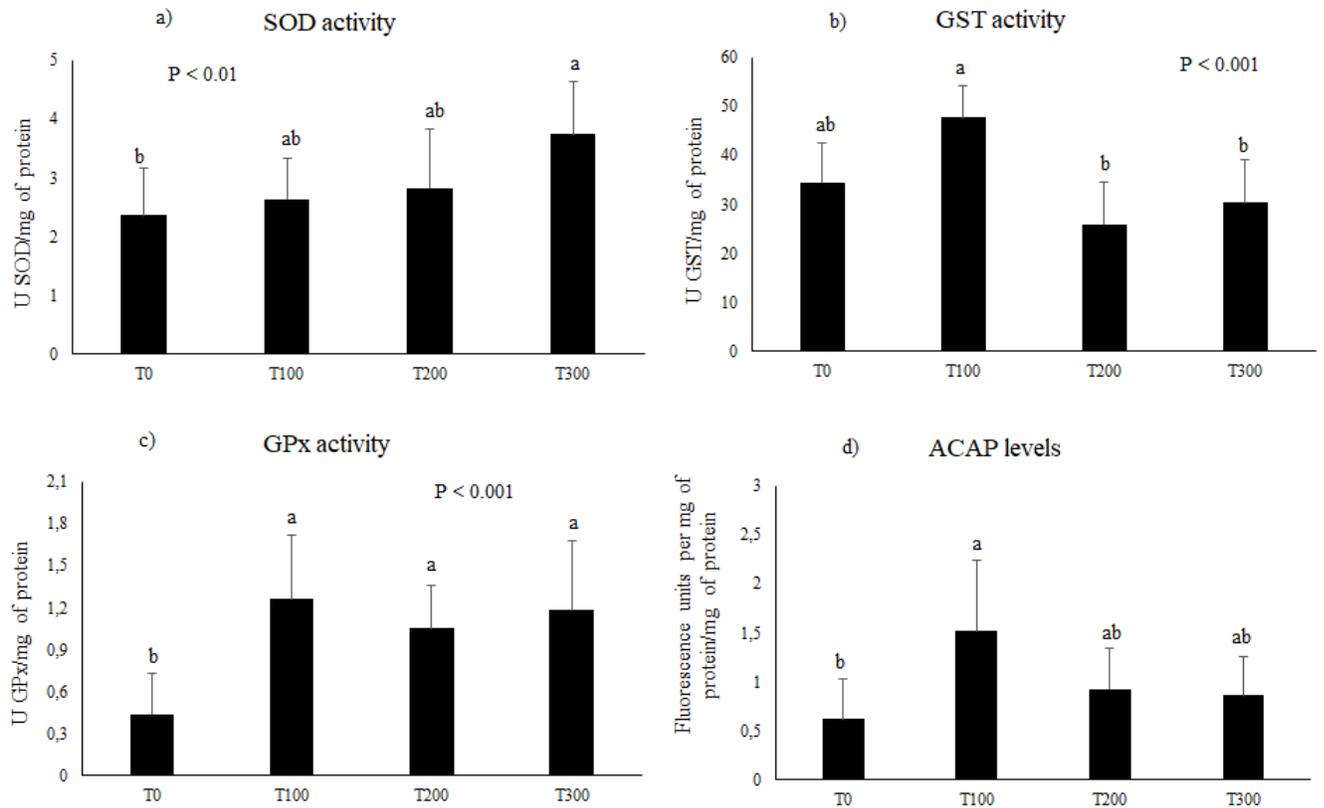


Figure 2: Hepatic superoxide dismutase (SOD) [A], glutathione S-transferase (GST) [B], glutathione peroxidase (GPx) [C] activities, and antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) [D] levels of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with different thymol levels for 60 days. Bars with different letters indicate significant difference between groups at $p < 0.05$

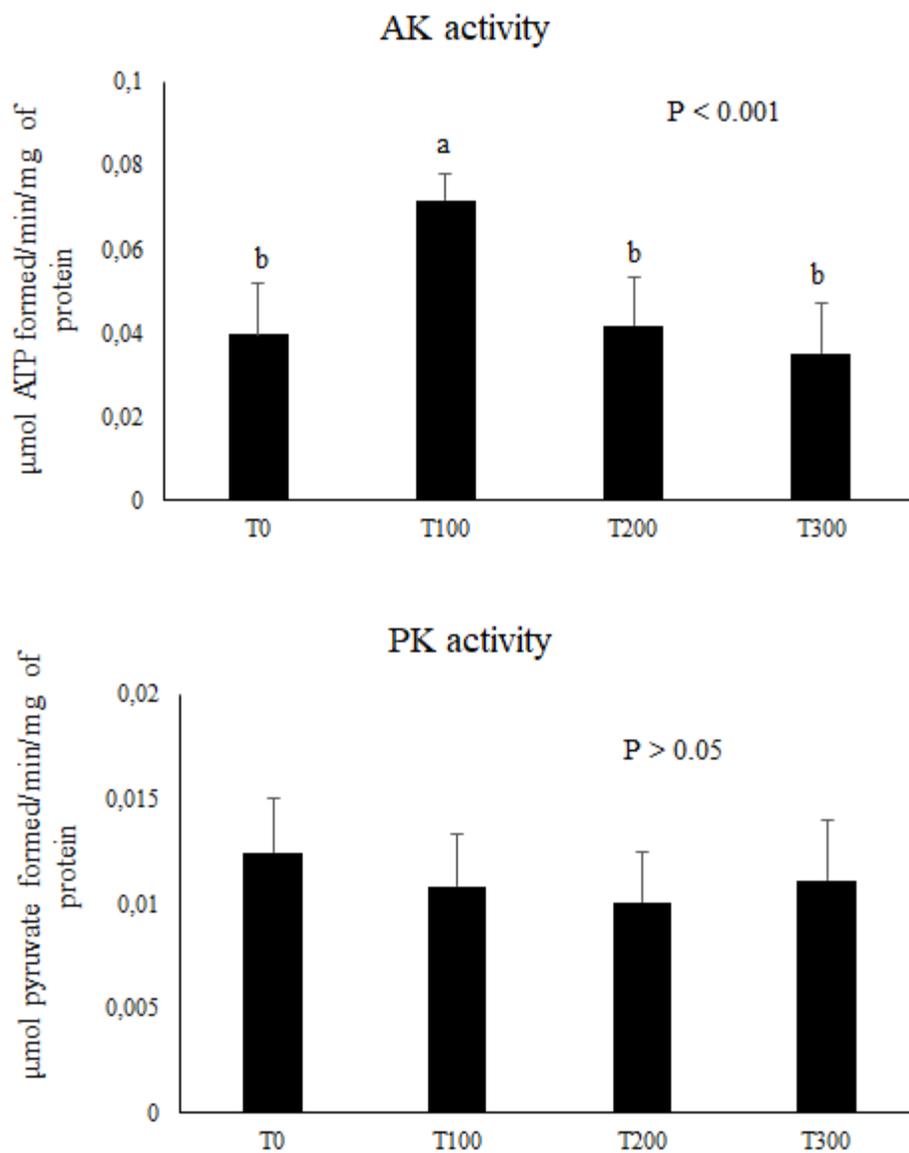


Figure 3: Hepatic adenylate kinase (AK) [A], pyruvate kinase (PK) [B] of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with different thymol levels for 60 days. Bars with different letters indicate significant difference between groups at $p < 0.05$

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo era para ser feito inicialmente com tilápias, porém houve alguns contratemplos e para não perdermos os prazos realizamos com carpa capim. O uso de 100 mg de timol/kg de suplementação dietética de timol aumentou o ganho de peso de juvenil de carpa capim, sendo que estatisticamente verificamos que a dose calculada para ganho de peso foi de 72,6 mg de timol/kg. Além disso, a suplementação dietética de timol (100 mg/kg de ração) foi capaz de melhorar o metabolismo hepático, enquanto praticamente todas as concentrações testadas aumentaram o status antioxidante hepático, que pode ter potencializado a melhoria de desempenho de crescimento dos juvenis. No entanto, é importante notar que, de acordo com a análise estatística, doses ainda mais baixas de timol podem potencializar o desempenho da carpa. Desta forma aprimorar o uso de timol, para carpas capim, e determinar a dose ideal de utilização é necessário a realização de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

ACEB. 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura – Brasil. Associação Cultural e Educacional Brasil, Brasília, DF, 136 p., 2014.

ALY, S.M.; MOHAMED, M.F. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, n.5, p.31-39, 2010

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 789 – 796, 2012.

BRABO, M.F. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 1, n. 9, p.50-58, jun. 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/TOSHIBA/Downloads/5457-15726-5-PB(1).pdf>. Acesso em: 25 maio 2017.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.** 1999, vol.12, n.2, pp.123-130.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2013**. Brasília: República Federativa do Brasil. 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **British J. Pharmacol.** v.147, p.S172-S181. 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **Trends in pharmacol. Sci.** 27, 166.2006.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in Pharmacol. Sci.** v.27, p.166. 2006.

BUTOLO, J.E. **Alimentos Funcionais.** In Anais... I Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes. Botucatu, São Paulo, Brasil. 2005.

CAMARGOL, J.B.J.; NETO, J.R.; EMANUELLI, Tatiana; LAZZARI, Rafael; COSTA, Mário Leão; LOSEKANN, Marcos Eliseu; LIMA, Ronaldo Lima de; SCHERER, Rodrigo; AUGUSTI, Paula Rossini; PEDRON, F.A.; MEDEIROS, T.S. Rearing of grass carp fingerlings (*Ctenopharyngodon idella*) fed with ration and cultivate pastures. **R. Bras. Agrociência, Pelotas**, v. 12, n. 2, p. 211-215, abr-jun, 2006.

CLARKSON, P.M; THOMPSON, H.S. **Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?** Am J Clin Nutr. 2000; 72(2):637-46

CNAANI, A.; TINMAN, S.; AVIDAR, Y.; RON, M.; HULATA, G. **Comparative study of biochemical parametes in response to stress in *Oreochomis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*.** Aquaculre Reserch, v. 35, p. 1431-1440, 2004.

COIMBRA J. L. et al. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n7/31205>> Acesso em: 19/04/2019.

DAVIS, K. B.; PARKES, N. C. Plasma corticoisteriod stress response of fourteen species os warmwater to transportation. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 115, p. 495 – 499, 1986.

DAVIS, L.E.; SCHRECK, C.B. The energetic response to handling stress in juvenile Coho salmon. **Transactions of the American Fisheries Society.**, v. 126, p. 248 – 258, 1997.

DE FRANCESCHI, I.D et al. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. **Neurochemical Research**, v.3. p. 632-643, 2013.

DZEJA, P.P.; TERZIC, A. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. **The Faseb Journal**, v. 12, p. 523-529, 1998.

EPAGRI. **Manual de reprodução de peixes de água doce com cultivo comercial na Região Sul do Brasil**. BOLETIM TÉCNICO Nº 136, 2007. Disponível em: <http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/biblioteca/57223.pdf>. Acessado em 13/04/2019.

EUROSTAT. **A Carpa: *Cyprinus carpio***. Statistics in focus. Disponível em: https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/carp_pt.pdf. Acessado em 08/04/2019.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas pra a Alimentação e Agricultura**, 2014.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas pra a Alimentação e Agricultura**, 2016.

FERRARI, Carlos K.B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**. 2004; 5(5): 275-9.

FERREIRA, A.L.A, MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997.

FIGUEIREDO, H.C.P.; GODOY, D.T. & GOMES, C.A. Sanidade aquícola: antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.16(105): p.42-49, 2008a. Disponível em:

<https://panoramadaaquicultura.com.br/saude-aquicola-antibioticos-na-aquicultura/>.

Acessado em 13/04/2019.

FOO, K.; BLUMENTHAL, L.; MAN, H. Regulation of neuronal bioenergy homeostasis by glutamate. **Neurochemistry International**, v.61, p. 389-396, 2012.

FRIEDRICH, C. Pharmacists in German Cultural History. **An. Real Acad. Farm.**, 80, 600-613, 2014.

FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. **J. Appl. Bacteriology**, 66:365-378

GETTYS, L. A. et al. Biology and control of aquatic plant: a best management practices handbook. **Aquatic Ecosystem Restoration Foundation**, 2009. 210 p.

GREEN, K; BRAND, M.D; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. 2004; 53(Suppl 1): 110-8.

GLORIA-BOTTINI, F. et al. Adenylate kinase locus 1 polymorphism and fetoplacental development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 19, p. 273-275, 2011.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 2004; 142(2): 231-55.

HOLLAND, R.D.; WILKES, J.G.; COOPER, W.M.; ALUSTA, P.; WILLIAMS, A. PEARCE, B.; BEAUDOIN, M.; BUZATU, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. **Mass Spectrom**, v.28, p.2617– 2626, 2014.

IBGE. **Pesquisa pecuária municipal 2015**. Brasília: IBGE 2015. v.43.

JANSSEN, E. et al. Impaired intracellular energetic communication in muscle from creatine kinase and adenylate kinase (M-CK/AK1) double knock-out mice. **Journal Biological Chemical**, v. 278, p. 30441-30449, 2003.

KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.** vol.16 no.4 Campinas Oct./Dec. 2003

LA ROSA, M. G. N. **Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta**. 2011. 98 f. Tese (Doutorado) Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá, 2011.

LIMA, D.S.; LIMA, J. C.; CALVACANTI, R. M. C. B.; SANTOS, B. H. C. dos; LIMA, I.O. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Rev Pan-Amaz Saude** 2017; 8(1):17-21.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L; P.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 674, p. 137-147, 2009.

MARQUES, N. R.; HAYASHI C.; GALDIOLI, E. M.; SOARES, T.; FERNANDES, C. E. B. Frequência de alimentação diária para alevinos de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*, v.). **Boletim Insttisto Pesca**, São Paulo, 34(2): 311 - 317, 2008. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/34_2_311-317.pdf. Acessado em 19/04/2019.

MCDONALD, G; MILLIGAN, L. Ionic, **Osmotic and Acid-base regulation in stress**. In: IWAMA, G.K. et al. (Ed.) *Fish stress and health in aquaculture*. New York: University Press, cap. 5, p. 119-144, 1997.

MELLO, A. R. de; STIPP, N.A. F. **A Piscicultura em Cativeiro como Alternativa Econômica para as Áreas Rurais**. *Geografia*, Londrina, v. 10, n. 2, p. 175-193, jul./dez. 2001. Disponível em: [file:///C:/Users/Cliente/Downloads/8576-30772-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Cliente/Downloads/8576-30772-1-PB%20(1).pdf). Acessado em 13/04/2019.

MILLEZI A.F.; BAPTISTA N.N.; CAIXETA D.S.; ROSSONI D.F.; CARDOSO M.G.; PICCOLI R.H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.1, p.18-24, 2014.

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.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**, 5th Ed. W.H. Freeman and Company, New York. 2008.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 7, 28-35, 2012

OLIVEIRA, DANIELA HARTWIG DE; FARIAS, ANELISE MELCHEQUE; CLEFF, MARLETE BRUM; MEIRELES, MÁRIO CARLOS ARAÚJO; RODRIGUES, MARIA REGINA ALVES. **Caracterização química do óleo essencial de organum**. 2008. Disponível em https://www.researchgate.net/profile/Mario_Meireles/publication/267699269_CHARACTERIZACAO_QUIMICA_DO_OLEO_ESSENCIAL_DE_ORIGANUM_VULGARE_ANALISE

[DA RELACAO TIMOLCARVACROL/links/5655f77908aeafc2aabee1fe.pdf](#). Acessado em 08/04/2019.

PEIXE BR – Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Brasileiro da Piscicultura**. São Paulo, 2019

PEIXOTO-NEVES D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M.D.; LIMA, F.C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.; CECCATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 24, 341-350, 2010.

PÍPALOVÁ, I. Initial impact of low stocking density of grass carp on aquatic macrophytes. **Aquatic Botany, Amsterdam**, v.73, n.1, p.9-18, 2002.

PÍPALOVÁ, I. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) grazing on duckweed (*Spirodela polyrhiza*). **Aquaculture International**, London, v.11, n.4, p.325-336, 2003.

POZZO, M. D.; VIEGAS, J.; SANTURINO, D.F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, Santa Maria. Disponível em <file:///C:/Users/Cliente/Downloads/CR-4127-40093-265085-1-PB.pdf>. Acessado em 13/04/2019.

GARCIA-GARCIA R.M, PAULO-GARCIA E. Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés em alimentos. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 2 – 2** (2008): 41 – 54.

RIBEIRO, Paula Adriane Perez; MELO, Daniela Chemim de; COSTA, Leandro Santos; TEIXEIRA, Edgar de Alencar. **Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce**. Belo Horizonte –MG 2012. Disponível em <https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/EDITORIA/20131002140549.pdf>. Acessado em 19/04/2019.

ROTTA, Mauricio Aurélio. **Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/811108/1/DOC53.pdf>. Acessado em 18/04/2019.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M.C.M.; LIMA, M.R. Extratos vegetais como aditivos para rações para peixes. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 6, nº 1, p. 789 – 800, janeiro/fevereiro de 2009. Disponível em http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/077V6N1P789_800_JAN2009_.pdf. Acessado em 19/04/2019.

SCHALCH, Sergio H. C. et al. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos, Editora Pedro & João, v. 1, 2015. 429p. Disponível em: <http://www.vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/LIVRO%20PRONTO_VOLUME%20I%20-%20aquicultura%20no%20Brasil.pdf> Acesso em: 19/04/2019.

SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, Alvaro Reischak. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, vol. 10, Nº 4 – Jul/Ago, 2004.

SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: Série estudos mercadológicos**. Brasília: Editoração eletrônica, 2015, 76p. Disponível em: [www.bibliotecassebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS-_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecassebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS-_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf). Acessado em: 25/05/2017.

SEBRAE. **Espécie de pescado mais cultivadas no Brasil**. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/especies-de-pescado-mais-cultivadas-no-brasil/>. Acessado em 08/04/2019.

Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP). 2007. Disponível em http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/. Acesso em: 23/05/2017.

SEGAL, L.D. et al. **Toxoplasma as a model genetic system.** In: SMITH, D.F.; PARSON, M. (Ed.). *Molecular Biology of Parasitic Protozoa.* Oxford University Press. P. 55-74, 1995.

SHAMI, Najuda Juma Ismail Esh; MOREIRA, Emília Addison Machado. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** vol.17 no.2 Campinas Apr./June 2004.

SILVA, A.F.; CRUZ, C.; PITELLI, R.L.C.M; PITELLI, R.A. Uso de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) como agente de controle biológico de macrófitas aquáticas submerses. **Planta Daninha**, v.32 no.4 2014. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582014000400011. Acessado em 19/04/2019

SMALL, B. C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p. 589 – 596, 2004.

STANLEY, J. G. et al. Reproductive requirements and likelihood for naturalization of escaped grass carp in the United States. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 107, n. 1, p. 119-128, 1978.

THURSTON, R.V.; RUSSO, R.C.; VINOGRADOV, G.A. Ammonia toxicity to fishes. Effect of pH on the Toxicity of the Un-ionized ammonia. **American Chemical Society**, 15, 837-840. 1981.

TORT, L. **Impact os stress in health and reproduction.** In: FARRELL, A.P.; CECH, J.J.; RICHARDS., J. G.; STEVENS, E.D. (Eds). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment.* Ed: Elsevier, p. 2266, 2011

TOREN, A. et al. Congenital haemolytic anaemia associated with adenylate kinase deficiency. **British Journal of Haematology**, v.87, p. 376-380, 1994.

VADSTEIN, O. **The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges.** **Aquaculture**, 155(1-4): 405-421, 1997.

VALENTINI, G. et al. **The allosteric regulation of pyruvate kinase.** **Journal Biology Chemical**, v. 275, p. 18145-18152, 2000.

WENDELLAAR BOGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77. P. 591 – 625, 1997.

WENDELAAR BOGA, S. E. **Hormonal responses to stress: Hormone response to stress**
In: FARREL, A. P.; CECH, J. J.; RICHARDS, J. G.; STEVENS, E.D. (Eds). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment.** Ed: Elsevier, Vancouver, p. 2266, 2011.

WU, G.; YUAN, C.; SHEN, M.; TANG, J.; GONG, Y.; LI, D.; SUN, F.; HUANG, C.; HAN, X. Immunological and biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*) after Qompsell feed ingredients for longterm administration. **Aquaculture Research**, v.38, n.3, p.246-255,2007.

ANEXO



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Adição de timol na dieta de tilápia: efeitos sobre desempenho e ação antimicrobiana protetora contra infecção por *Aeromonas* spp.", protocolada sob o CEUA nº 8817050418 (00 000636), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 06/06/2018.

We certify that the proposal "Addition of thymol in tilapia diet: effects on performance and protective antimicrobial action against infection by *Aeromonas* spp.", utilizing 160 Fishes (males and females), protocol number CEUA 8817050418 (00 000636), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 06/06/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **07/2019** Área: **Zootecnia**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **40 a 150 dias** N: **160**

Linhagem: **Tilapias**

Peso: **8 a 10 g**

Local do experimento: O projeto vai ocorrer no município de Chapecó-SC, na UDESC-CEO, em galpão experimental em construção que vai abrigar o Laboratório de Piscicultura da UDESC Oeste.

Lages, 02 de abril de 2019

Marcia Regina Pfuetzenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina