

MÁRCIO YOSHIYUKI KANASHIRO

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE ORÉGANO EM DIETAS PARA  
LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax altiparanae*) EM  
DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

K16a  
2015

Kanashiro, Márcio Yoshiyuki, 1986-

Avaliação do óleo de orégano em dietas para  
Lambaris-do-Rabo-Amarelo (*Astyanax altiparanae*) em  
diferentes densidades de estocagem / Márcio Yoshiyuki  
Kanashiro. – Viçosa, MG, 2015.

xvi, 36f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Peixes - Alimentações e rações. 2. Peixe - Desempenho.  
3. *Astyanax altiparanae*. 4. Extratos vegetais. 5. Estresse  
oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia  
Animal. II. Título.

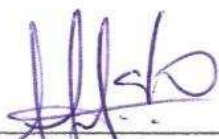
CDD 22. ed. 639.37

MÁRCIO YOSHIYUKI KANASHIRO

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE ORÉGANO EM DIETAS PARA  
LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax altiparanae*) EM  
DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

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

APROVADA: 15 de maio de 2015.




Ana Lucia Salaro  
(Coorientadora)



Ronald Kennedy Luz



Suellen Silva Condessa



Jener Alexandre Sampaio Zuanon  
(Orientador)

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de *meus olhos.*"

(Isaac Newton)

Dedico aos meus pais, **Paulo e Emília.**

Obrigado pela educação, compreensão e apoio ao longo desse caminho. Agradeço todo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até esse momento e saibam que, essa conquista é, principalmente, para vocês. Se eu conseguir ser metade do que vocês são, estarei satisfeito, saiba que amo vocês!!!

Dedico aos meus irmãos, **Marcos e Marcelo.**

Obrigado pelo apoio, incentivo e conselhos, saibam que me espelho muito em vocês.

Dedico a minha sobrinha, **Eduarda.**

Obrigado pelo carinho, amor e companheirismo!!!

Dedico ao meu orientador, **Jener Alexandre Sampaio Zuannon**.

Agradeço a confiança ao longo desses anos, principalmente por ter me aceitado como seu orientado sem, ao menos, me conhecer, por ter acompanhado o trabalho realizado ao longo desse período, pela paciência em alguns momentos e pelo exemplo de profissional. Obrigado por ter me guiado durante esses anos, VAI TIMÃO!!!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que sempre está comigo, guiando e inspirando em todos os momentos de minha vida;

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)**, pela estrutura e oportunidade para realização da minha Pós-graduação em Biologia Animal;

À **Fundação de Apoio a Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** pelo financiamento do projeto de pesquisa;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa durante a realização deste curso;

Ao **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, pela sua disponibilidade em me orientar e toda ajuda prestada durante meu mestrado;

À **Profª. Drª. Ana Lúcia Salaro**, por me coorientar e ajudar em todas as etapas do meu mestrado, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pode ter certeza de que contribuiu muito para minha formação e possibilitar a realização deste trabalho nos Laboratórios do Setor de Piscicultura.

À **Profª. Drª. Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Células e Ecofisiologia do Departamento de Biologia Animal para as análises de estresse oxidativo.

Ao **Prof. Dr. Edenio Detmann**, pela disponibilização do Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia para a realização das análises químicas;

À **Profª. Drª. Luciana Navajas Rennó** pela disponibilização do Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, do Departamento de Zootecnia para a realização da análise sanguínea;

Aos **Professores** que tive durante o mestrado, por todo conhecimento compartilhado;

Aos funcionários do Setor de Piscicultura da UFV, **João Antônio de Oliveira** e **José Francisco Delfino** pelos ensinamentos, auxílios e pela ajuda prestada durante o mestrado, principalmente na época do experimento;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal **Adnílson Brasileiro**, pelos vários esclarecimentos e ajudas dadas durante minha formação;

Ao técnico de laboratório do Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia **Faustino Pereira Monteiro**, pela ajuda das análises químicas.

À aluna de doutorado **Jerusa de Oliveira**, pela ajuda nas análises de estresse oxidativo.

Aos ex alunos do programa de mestrado em Biologia Animal (DBA/UFV), **Daniel Abreu Vasconcelos Campelo**, **Luiz Thiago Versiani Miranda**, **Pollyana de Moraes França Ferreira**, **Lidiane da Silva Nascimento**, **Frederico Werneck Lima**, **Alfredo Rubén Palomino**, aos pós-graduandos em Biologia Animal, **Uyara Duarte Vieira**, **Sendy Moreira Reis**, **Isabel Gertrudes Arrigui de Araújo Neves**, **Renato Barbosa Ferraz**, **Mariana Molica**, **José Carlos de Oliveira Junior**, **Willian Chaves**, aos estudantes de Iniciação Científica e estagiários do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal **Alex da Silva Junio Cardoso**, **Juliana Rodrigues Gomes** e **André Luis Fialho Ladeira**, por toda ajuda prestada, ensinamentos, companheirismo e colaboração durante todos estes anos de convivência;

Agradeço aos meus familiares e amigos

Aos meus pais, **Paulo Yoshiyuki Kanashiro** e **Emília Michiko Tomimatsu Kanashiro**, pelo amor e dedicação me oferecido em todos esses anos;



Aos meus irmãos e sobrinha, **Marcos Yoshitomi Kanashiro, Marcelo Yoshifumi Kanashiro e Eduarda Satie Kanashiro**, pelo companheirismo e carinho a todo momento;

Aos meus avós, **Yoshikiti Kanashiro** (in memoriam), **Yukie Tan, Shoichi Tomimatsu e Quieko Tomimatsu**, pelo exemplo sabedoria que sempre me passaram;

Aos meus tios e primos, em especial para meus padrinhos, **Getúlio Minamihara e Clara Kazumi Tomimatsu Minamihara**, meus tios, **Paulo Yoshihiro Nakano, Terezinha Megumi Kanashiro Nakano, Nelson Takeshi Tomimatsu e Maria Fátima Akemi Iwakura**, pela ajuda e carinho quando precisei;

Aos meus companheiros de república “GROZOP”, **Japa, Negão, Rogerim, Kyr, Guh, Tupete, Boy, Caracu, Tufão, Jão, Tafarel, Marcelão, End**, pelo convívio e aprendizado nesse tempo que moramos juntos;

Aos meus amigos de Viçosa, Curitiba e de Alta Floresta, pela parceria e companheirismo mesmo a distância;

A todos que de alguma forma me fizeram crescer e colaboraram para que isto fosse possível.

**Muito Obrigado**

## **BIOGRAFIA**

Márcio Yoshiyuki Kanashiro nasceu em 07 de maio de 1986 em Londrina - PR, Brasil. Filho de Paulo Yoshiyuki Kanashiro e Emília Michiko Tomimatsu Kanashiro.

Em julho 2011 graduou em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em 1 de abril de 2013 ingressou no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, nível mestrado da Universidade Federal de Viçosa.

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
Resumo .....	2
1. Introdução.....	3
2. Material e Métodos.....	4
2.1. Animais e Condições Experimentais .....	4
2.2. Desempenho produtivo .....	7
2.3. Respostas de estresse.....	7
2.4. Estresse oxidativo .....	8
2.5. Análises histopatológicas das brânquias .....	9
2.6. Qualidade de água .....	10
2.7. Análises estatísticas.....	10
3. Resultados.....	11
3.1. Desempenho produtivo .....	11
3.2. Respostas de Estresse .....	11
3.3. Estresse oxidativo.....	19
3.4. Histopatologia branquial .....	19
4. Discussão .....	28
5. Conclusões.....	30
6. Referências .....	31
Anexo I.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química do óleo de orégano fornecida pelo fabricante.....	5
Tabela 2 Formulação e composição química das dietas experimentais. ....	6
Tabela 3 Desempenho produtivo e índices corporais de <i>Astyanax altiparanae</i> cultivados em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ). ....	12
Tabela 4 Respostas de estresse de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	17
Tabela 5 Estresse oxidativo nas brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ). ....	20
Tabela 6 Índice de histopatologia branquial (IHB) em <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ). ....	20
Tabela 7 Parâmetros de água no cultivo de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	24
Tabela 8 Amônia tóxica na água de cultivo de <i>Astyanax altiparanae</i> cultivados em diferentes densidades, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	25

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Ganho de peso de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	14
Fig. 2. Taxa de crescimento específico de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	14
Fig. 3. Biomassa final de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	15
Fig. 4. Conversão alimentar de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	15
Fig. 5. Índice hepatossomático de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	16
Fig. 6. Glicose sanguínea de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	18
Fig. 7. Cortisol plasmático de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	18
Fig. 8. Malondialdeído nas brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	21
Fig. 9. Superóxido dismutase nas brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidade, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	21
Fig. 10. Índice de histopatologia branquial (IHB) de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	22
3.5. Qualidade de Água .....	23
Fig. 11. Oxigênio dissolvido na água de cultivo de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	25
Fig. 12. Nitrito na água de cultivo de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg <sup>-1</sup> ).....	26

Fig 13. pH na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).....26

Fig 14. Amônia tóxica na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades e alimentados com dieta sem óleo de orégano.....27

Fig 15. Amônia tóxica na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades e alimentados com dieta com óleo de orégano.....27

## RESUMO

KANASHIRO, Márcio Yoshiyuki, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2015. **Avaliação do óleo de orégano em dietas para lambaris-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em diferentes densidades de estocagem.** Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadora: Ana Lúcia Salaro.

A densidade de estocagem pode influenciar o crescimento dos peixes, podendo levar a diminuição do bem-estar e comprometer a saúde dos animais. Para minimizar os efeitos adversos de densidades de estocagem inadequadas, tem-se utilizado promotores de crescimento em suas dietas. Dentre os produtos utilizados na produção animal com esse propósito destacam-se as plantas aromáticas, seus extratos e óleos essenciais. Um dos óleos essenciais com potencial para ser usado como aditivo em rações animais é o óleo de orégano, extraído da planta *Origanum vulgare*, em função de suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-helmíntica e digestiva. Assim, com o presente estudo objetivou-se avaliar o efeito da densidade de estocagem sobre o desempenho produtivo e o bem estar de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), bem como avaliar o potencial do óleo de orégano como modulador das respostas de estresse. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com quatro densidades de estocagem e duas dietas, com quatro repetições. Foram avaliadas quatro densidades de estocagem (0,17; 0,42; 0,58 e 0,75 peixes L<sup>-1</sup>) e duas dietas práticas, sendo uma controle, sem óleo de orégano, e uma contendo 0,5 g kg<sup>-1</sup> de óleo de orégano. Os peixes (3,44 ± 0,06 g) foram mantidos em aquários contendo 60L de água, dotados de aeração, filtro biológico e temperatura controlada por aquecedores e termostatos (27 ± 1°C). Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia, durante 120 dias. Ao final do período experimental foram avaliados o desempenho produtivo, a qualidade da água, as respostas de estresse, estresse oxidativo e patologias nas brânquias. A avaliação dos efeitos da densidade de estocagem e suplementação com óleo de orégano na dieta sobre as variáveis estudadas foi realizada por meio de análise de variância e de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade. Não houve interação significativa entre as densidades de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta para as variáveis estudadas, exceto para amônia tóxica. Houve efeito da densidade sobre o oxigênio dissolvido, pH e nitrito na água. Para o oxigênio dissolvido observou-se efeito linear decrescente, para nitrito, efeito linear crescente e para o pH, efeito quadrático da densidade de estocagem, com valor estimado que

minimiza essa variável igual a 0,62 peixes L<sup>-1</sup>. Para amônia tóxica, observou-se efeito quadrático da densidade para os peixes alimentados com a dieta controle, com valor estimado que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup>, enquanto que para os peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano observou-se efeito linear crescente da densidade. A concentração de amônia tóxica na água dos peixes alimentados com a dieta controle foi maior que a dos peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano, na densidade de 0,75 peixes L<sup>-1</sup>. Para a glicose houve efeito quadrático da densidade de estocagem, sendo estimado o valor que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup>. Para o cortisol plasmático houve efeito quadrático da densidade de estocagem, sendo estimado o valor que maximiza essa variável igual a 0,53 peixes L<sup>-1</sup>. Para a concentração de malondialdeído houve efeito linear crescente da densidade de estocagem e para a enzima superóxido dismutase houve efeito quadrático da densidade, com valor estimado que minimiza essa variável igual a 0,57 peixes L<sup>-1</sup>. Para a enzima catalase houve efeito significativo da dieta, com menor valor para os peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano. Para o índice de histopatologia branquial houve efeito linear crescente da densidade de estocagem. Os resultados de qualidade de água (amônia tóxica) e da concentração de glicose sanguíneo indicam que a melhor densidade de estocagem para essa espécie é de 0,31 peixes L<sup>-1</sup>. Dessa forma, pode-se concluir as mais altas densidades de estocagem utilizadas comprometem o desempenho produtivo, o bem estar e a integridade branquial de *Astyanax altiparanae*. O óleo de orégano não atua como modulador das respostas de estresse, porém, atua no metabolismo do nitrogênio, com menor excreção de amônia em *Astyanax altiparanae*.



## ABSTRACT

KANASHIRO, Márcio Yoshiyuki, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2015. **Oregano oil assessment in diets for minnows from the lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) at different stocking densities.** Advisor: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisor: Ana Lúcia Salaro.

The stocking density can influence positively or negatively the fish growth and can lead to decreased welfare and compromise the health of animals. To minimize the adverse effects of inadequate stocking densities, growth promoters have been used in their diets. Among the products used in animal production for this purpose there are the herbs, their extracts and essential oils. One of the essential oils with the potential to be used as a growth promoter in animal feed is the oregano oil, extracted from the plant *Origanum vulgare*, due to its antibacterial, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, anthelmintic and digestive properties. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of stocking density on growth performance and welfare of the lambari (*Astyanax altiparanae*), and to assess the oregano oil's potential as a modulator of the stress responses. The experimental design was completely randomized in a factorial design with four stocking densities and two diets, with four replications. Four stocking densities (0.17; 0.42; 0.58 and 0.75 fish L<sup>-1</sup>) and two diets were evaluated, being one control without oregano oil and one containing 0.5 g kg<sup>-1</sup> of oregano oil. Fish (3.44 ± 0.06 g) were kept in aquaria containing 60L of water, equipped with aeration, biological filter and temperature controlled heaters and thermostats (27 ± 1 ° C). Fish were fed to apparent satiation four times a day during 120 days. At the end of the experiment were evaluated the productive performance, water quality, stress responses, oxidative stress and diseases in the gills by calculating the gill histopathology index. The assessment of the effects of stocking density and oregano oil supplementation on the variables studied was performed by analysis of variance and polynomial regression at 5% probability. There was no significant interaction between stocking densities and the oregano oil supplementation in the diet for the studied variables, except for toxic ammonia. There was a significant effect of density for dissolved oxygen, pH and nitrite in the water. It was observed decreasing linear effect for dissolved oxygen, increasing linear effect for nitrite, and quadratic effect for pH, with the estimated value that minimizes this variable equal to 0.62 L<sup>-1</sup> fish. To toxic ammonia was observed quadratic effect the density for fish fed the control diet, estimated that minimizes this variable equals 0.31 fish L<sup>-1</sup>, while for fish

fed the diet supplemented with oil oregano there was a linear increase in density. The toxic ammonia content in the water of the fish fed the control diet was higher than that of fish fed the diet supplemented with oregano oil in the stocking density 0.75 fish L<sup>-1</sup>. For glucose, quadratic effects of stocking density was observed, with the estimated value that minimizes this variable equal to 0.31 fish L<sup>-1</sup>. For plasma cortisol, it was observed quadratic effects of stocking density, with the estimated value that maximizes this variable equal to 0.53 fish L<sup>-1</sup>. For the malondialdehyde content there was a linear increase of stocking density and the enzyme superoxide dismutase there was a quadratic effect of stocking density, with the estimated value that minimizes this variable equal to 0.57 fish L<sup>-1</sup>. For the enzyme catalase, it was observed significant effect of diet with lower value for fish fed the diet supplemented with oregano oil. For the gill histopathology index it was observed increasing linear effect of stocking density. The results of water quality (toxic ammonia) and blood glucose level indicates that the best stocking density of this species is 0.31 fish L<sup>-1</sup>. Thus, it can be concluded that high stocking densities used undertake productive performance, welfare and gill integrity of the *Astyanax altiparanae*. Oregano oil does not act as a modulator of stress responses, however, operates on nitrogen metabolism, with lower ammonia excretion in *Astyanax altiparanae*.

AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE ORÉGANO EM DIETAS PARA  
LAMBARIS-DO-RABO-AMARELO (*Astyanax altiparanae*) EM  
DIFERENTES DENSIDADES DE ESTOCAGEM

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

**Resumo:** Juvenis de *Astyanax altiparanae* foram cultivados em quatro densidades de estocagem (0,17; 0,42; 0,58 e 0,75 peixes L<sup>-1</sup>) e alimentados com duas dietas, sendo uma controle e uma contendo 0,5 g kg<sup>-1</sup> de óleo de orégano. Para amônia tóxica, observou-se efeito quadrático da densidade para os peixes alimentados com a dieta controle, sendo o valor que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup>, enquanto que para os peixes alimentados com a dieta contendo óleo de orégano observou-se efeito linear crescente da densidade. Na densidade de 0,75 peixes L<sup>-1</sup> a concentração de amônia tóxica na água dos peixes alimentados com a dieta controle foi maior que a dos peixes alimentados com a dieta contendo óleo de orégano. Para a glicose houve efeito quadrático da densidade de estocagem, sendo o valor que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup>. Para o cortisol plasmático houve efeito quadrático da densidade, sendo o valor que maximiza essa variável igual a 0,53 peixes L<sup>-1</sup>. Para a concentração de malondialdeído houve efeito linear crescente da densidade e para a enzima superóxido dismutase houve efeito quadrático da densidade, sendo o valor que minimiza essa variável igual a 0,57 peixes L<sup>-1</sup>. Para a enzima catalase observou-se menor valor para os peixes alimentados com a dieta contendo óleo de orégano. Para o índice de histopatologia branquial houve efeito linear crescente da densidade. Assim, conclui-se que altas densidades comprometem o desempenho produtivo, o bem estar e a integridade branquial de *Astyanax altiparanae*. O óleo de orégano não atua como modulador das respostas de estresse, porém, atua no metabolismo do nitrogênio, com menor excreção de amônia em *Astyanax altiparanae*.

**Palavras-chave:** Desempenho produtivo, resposta de estresse, estresse oxidativo e extratos vegetais.

## 1. Introdução

A América do Sul destaca-se por apresentar grande diversidade na ictiofauna, bem como abundância de recursos hídricos e clima favorável ao cultivo de peixes. Dentre as espécies cultivadas, o lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), uma espécie de água doce de pequeno porte, apresenta rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, maturidade sexual precoce e produção de alevinos sem necessidade de indução hormonal (Gonçalves et al., 2014; Campelo et al., 2014). Atualmente, a maior parte de sua produção atende o mercado de petiscos e iscas para pesca esportiva (Porto-Foresti et al., 2010). Entretanto, o aumento na produtividade dessa espécie ainda depende de estudos relacionados com a intensificação dos sistemas de produção.

A intensificação dos sistemas produtivos tem possibilitado aumentar a produtividade ocupando menor espaço físico, com melhor aproveitamento da água e menor impacto ambiental. Entretanto, com a intensificação da produção têm-se observado aumento da ocorrência de doenças nos organismos aquáticos (Costa, 2003; Segner et al., 2012; Souza-Filho & Cerqueira, 2003; Hasan et al., 2014) em função, principalmente, do estresse decorrente das altas densidades de estocagem (Ellis et al., 2002; Ashley, 2007; Vazzana et al., 2002; Gornati et al., 2004; Montero et al., 1999).

A utilização de densidades de estocagens inadequadas pode levar a diminuição do bem-estar, comprometer a saúde, causar redução no crescimento e induzir a comportamentos anormais dos peixes como, disputa hierárquica (Irwin et al., 1999), comportamento grupal para captura de alimento e disputa por espaço físico (Pouey et al., 2011; Ellis et al., 2002; Leonardo & Baccarin, 2014). Para minimizar esses efeitos tem-se utilizado promotores de crescimento nas rações para melhorar a saúde, a tolerância ao estresse e o desempenho produtivo dos animais (Mehrim, 2009). Dentre os produtos utilizados na produção animal com esse propósito destacam-se os probióticos, prebióticos, extratos e óleos essenciais de plantas aromáticas. Um dos óleos essenciais com grande potencial para ser utilizado como aditivo é o óleo de orégano (Fukayama et al., 2004; Ferreira et al., 2014; Zheng et al., 2009), extraído da planta *Origanum vulgare*, em função de suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-helmíntica e digestiva (Burt & Reinders,

2003; Sartoratto et al., 2004; Zheng et al., 2009; Azuma et al., 1986; Force et al., 2000; Cabuk et al., 2003). Suas propriedades são atribuídas à presença dos fenóis carvacrol e timol e dos monoterpênos  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno, entre outros (Bampidis et al., 2005; Zheng et al., 2009).

Assim, com o presente estudo objetivou-se avaliar o efeito da densidade de estocagem sobre o desempenho produtivo e o bem estar de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*), bem como avaliar o potencial do óleo de orégano como modulador das respostas de estresse.

## 2. Material e Métodos

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo nº 31/2012 (anexo I).

### 2.1. Animais e Condições Experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Peixes do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x2), com quatro repetições. Foram avaliadas quatro densidades de estocagem (0,17; 0,42; 0,58 e 0,75 peixes L<sup>-1</sup>) e duas dietas práticas isoprotéicas e isoenergéticas, sendo uma controle, sem óleo de orégano, e uma contendo 0,5 g kg<sup>-1</sup> de óleo de orégano. O nível de óleo de orégano utilizado foi estabelecido com base nos resultados obtidos para a mesma espécie por Ferreira et al. (2014). O óleo de orégano (óleo essencial de orégano orgânico LASZLO<sup>®</sup>), obtido a partir das folhas da planta *Origanum vulgare*, foi adicionado à dieta teste em substituição ao ingrediente inerte caulim. A composição química do produto é mostrada na tabela 1. O óleo de orégano foi previamente misturado com óleo de soja para então ser misturado aos demais ingredientes. A mistura foi peletizada, seca em estufa de ventilação forçada (30°C por 24h), triturada, peneirada e armazenada em geladeira.

Juvenis de lambari-do-rabo-amarelo pesando  $3,44 \pm 0,06$  g foram mantidos em 32 aquários contendo 60L de água, em sistema estático, dotados de aeração, filtros mecânico e biológico e temperatura controlada por aquecedores

e termostatos ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Os aquários foram cobertos com tela de nylon branca (malha 2 mm) para evitar a fuga dos peixes. O laboratório foi mantido em fotoperíodo de 12 horas, controlado por um temporizador.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia (8; 11; 14 e 17 horas). Os aquários foram sifonados a cada 15 dias para retirada de fezes. Ao final de 120 dias de experimento, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico (óleo de cravo  $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) para coleta das amostras.

Amostras das dietas-teste foram submetidas a análises quanto à composição química. Para determinação da proteína bruta foi utilizado protocolo descrito por Detmann et al. (2012). Extrato etéreo, matéria seca e cinzas foram determinadas de acordo com protocolo da AOAC (1990) e energia bruta obtida em bomba calorimétrica (Tabela 2).

**Tabela 1**

Composição química do óleo de orégano fornecida pelo fabricante.

<b>Constituinte</b>	<b><math>\text{g } 100\text{g}^{-1}</math></b>
$\alpha$ -thujeno	0,4
$\alpha$ -pineno	1,6
canfeno	0,7
sabineno	0,8
mirceno 1,4	1,4
$\alpha$ -terpineno	1,1
$\rho$ -cimeno	12,8
$\gamma$ -terpineno	8,4
1,8 cineol	0,3
hidrato cis sabineno	1,6
timol	4,7
carvacrol	63,0
$\beta$ -cariofileno	1,4

Método de análise: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890. Coluna: BP1 25m x 0,25mm (SGE). Temperaturas: Coluna:  $60^\circ\text{C}$  (3min),  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ , até  $200^\circ\text{C}$ . Injetor:  $250^\circ\text{C}$  Split: 1/200. Detector FID:  $250^\circ\text{C}$ . Vol. de injeção:  $1 \mu\text{L}$  (concentração 0,5% em clorofórmio).

**Tabela 2**

Formulação e composição química das dietas experimentais.

Ingrediente	Níveis de óleo de orégano nas dietas experimentais (g kg <sup>-1</sup> )	
	0,0	0,5
Farelo de Soja	612,0	612,0
Glúten de Milho	110,0	110,0
Fubá de Milho	123,1	123,1
Farelo de Trigo	60,0	60,0
Caulim	0,5	0,0
Óleo de Orégano	0,0	0,5
L - Lisina	0,9	0,9
DL - Metionina	2,3	2,3
Óleo de Soja	45,0	45,0
Fosfato Bicálcico	39,5	39,5
Sal comum	2,5	2,5
Suplemento vitam/min <sup>1</sup>	4,0	4,0
BHT <sup>2</sup>	0,2	0,2
Composição química das dietas experimentais		
Matéria seca (g kg <sup>-1</sup> )	906,2	931,4
Energia Bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4314,7	4358,3
Proteína Bruta (g kg <sup>-1</sup> )	357,1	357,4
Extrato Etéreo (g kg <sup>-1</sup> )	213,2	189,1
Cinzas (g kg <sup>-1</sup> )	85,4	97,20
Fósforo disponível <sup>3</sup>	7,1	7,1
Carvacrol <sup>4</sup>	0,0	0,32
Timol <sup>4</sup>	0,0	0,02
p-cimeno <sup>4</sup>	0,0	0,06
γ-terpineno <sup>4</sup>	0,0	0,04

<sup>1</sup>Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.200.000UI; Vit. D3, 200.000UI; Vit. E, 12.000mg; Vit. K3, 2.400mg; Vit. B1, 4.800mg; Vit. B2, 4.800mg; Vit. B6, 4.000mg; Vit. B12, 4.800mg; Ac. Fólico, 1.200mg; Pantotenato Ca, 12.000mg; Vit. C, 48.000mg; Biotina, 48mg; Colina, 65.000mg; Niacina, 24.000mg; Ferro, 10.000mg; Cobre, 6.000mg; Manganês, 4.000mg; Zinco, 6.000mg; Iodo, 20mg; Cobalto, 2mg; Selênio, 20mg.

<sup>2</sup>Butil hidroxi tolueno (antioxidante);

<sup>3</sup>Valores calculados para tilápia do Nilo conforme (Miranda et al., 2000)

<sup>4</sup>Valores calculados de acordo com a composição química do óleo de orégano apresentada pelo fabricante (Tabela 1).



## 2.2. Desempenho produtivo

Ao final do experimento os peixes de cada unidade experimental foram contados e pesados para avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho produtivo:

Taxa de Sobrevivência (TS) = número final de peixes/número inicial de peixes x 100;

Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial;

Biomassa final (BF) =  $\Sigma$  peso final dos peixes;

Consumo de ração (CR) = peso da ração inicial – peso da ração final;

Conversão alimentar (CA) = CR/GP;

Taxa de crescimento específico (TCE), utilizando a equação proposta por Ricker (1979), apresentada a seguir:

$$TCE = \frac{\ln PF (g) - \ln PI (g)}{\text{tempo(dias)}} \times 100 \quad ; \text{ em que:}$$

PI = peso inicial médio dos peixes (g);

PF = peso final médio dos peixes (g);

E os índices corporais;

Rendimento de carcaça (RC) = peso da carcaça/ peso vivo \* 100, (calculado separadamente para machos e fêmeas);

Índice viscerossomático (IVS) = peso das vísceras/peso vivo \* 100 (calculado separadamente para machos e fêmeas);

Índice gonadossomático (IGS) = peso das gônadas/peso vivo \* 100 (calculado separadamente para machos e fêmeas);

Índice hepatossomático (IHS) = peso do fígado/peso vivo \* 100;

## 2.3. Respostas de estresse

A análise da glicemia sanguínea foi realizada por meio de tiras reagente de glicose, utilizando-se monitor digital Accu-Chek Active® Roche e o lactato

sanguíneo foi mensurado por meio de tiras reagente de lactato, utilizando-se monitor digital Accutrend® Plus Roche. Para a coleta do sangue foi realizado corte com bisturi junto ao pedúnculo da nadadeira caudal dos peixes, e o sangue foi depositado diretamente nas tiras reagentes de dois peixes para a glicose (n = 8/tratamento) e um peixe para lactato (n = 4/tratamento), de cada unidade experimental.

A análise do cortisol foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, através de imunoensaio quimioluminescente. Para a coleta do sangue foi realizado corte com bisturi junto ao pedúnculo da nadadeira caudal dos peixes e o sangue foi coletado por meio de uma seringa de insulina heparinizada. Foram utilizados oito peixes de cada unidade experimental para obtenção de pool que permitisse a obtenção de quantidade de amostra suficiente para a realização das análises (n = 4/tratamento). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2795 g por 10 minutos para a coleta do plasma, que foi armazenado à -20°C.

#### 2.4. Estresse oxidativo

As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Após a incisão na região opercular em um dos lados da cabeça, as brânquias foram retiradas e fragmentos dos arcos, filamentos e lamelas branquiais (50 mg/peixe) foram coletadas de dois peixes por unidade experimental (n = 8/tratamento), conservadas em nitrogênio líquido até o término das coletas, e mantidas em freezer -80°C.

O tecido branquial foi homogeneizado em tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e a suspensão centrifugada (16100 g à 4°C por 10 minutos). Com o sobrenadante foram realizadas as análises das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona S-transferase e o produto da peroxidação lipídica malondialdeído.

Para catalase, a atividade enzimática foi mensurada no sobrenadante e determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mmol L<sup>-1</sup>) em espectrofotômetro a 240nm durante 60s (Abei, 1984).

Para superóxido dismutase, a atividade enzimática foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm (Dieterich et al., 2000) baseado na capacidade desta

enzima em catalisar a reação do superóxido  $O_2^-$  e o peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol.

Para glutathione S-transferase, a atividade enzimática foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorvância em 340 nm por 60s em espectrofotômetro. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima glutathione S-transferase. Uma unidade (U) de glutathione S-transferase equivale à quantidade de enzima que forma 1mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB 340 =  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  foi utilizado para os cálculos (Habig et al., 1974).

Para a determinação do malondialdeído foi adicionado ao sobrenadante a solução de TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N), os tubos foram mantidos em banho maria por 15 minutos, resfriados e centrifugados a 699 g por 5 minutos. Em seguida a concentração de malondialdeído foi mensurada em espectrofotometria a 535 nm (Buege & Aust, 1978).

## 2.5. Análises histopatológicas das brânquias

Após a incisão na região opercular em um dos lados da cabeça, as brânquias foram retiradas e fragmentos dos arcos, filamentos e lamelas branquiais foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, sendo transferidos posteriormente para álcool 70%. Os fragmentos branquiais foram colocados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Após a inclusão, foram feitas secções semi-seriadas de 3  $\mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1% e hematoxilina de Mayer e eosina, montadas com Entellan® (Merck).

As análises histopatológicas das brânquias foram conduzidas utilizando imagens digitais capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Animal (UFV). Foram observados dez campos aleatórios por repetição, nas quais foram quantificadas as porcentagens de cada patologia encontrada. Com base nesses

dados foi calculado o índice de histopatologia branquial de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{IHB} = \sum \% \text{ patologias} / \text{total de patologias}$$

## 2.6. Qualidade de água

Quinzenalmente foram aferidos oxigênio dissolvido, por meio de oxímetro, pH, amônia e nitrito, por meio de kits colorimétricos. A amônia tóxica ( $\text{NH}_3$ ) foi calculada com base na fórmula: amônia tóxica = amônia total /  $(1 + 10^{((0,0902 - \text{pH}) + (2730 / (273,2 + \text{temperatura}))))$ ). Após a aferição dos referidos parâmetros de qualidade de água, os aquários foram sifonados para a retirada das fezes.

## 2.7. Análises estatísticas

A avaliação do efeito da densidade de estocagem e da suplementação de óleo de orégano na dieta sobre as variáveis de desempenho produtivo, índices corporais, respostas de estresse, estresse oxidativo, histopatologias branquiais e qualidade de água foi realizada por meio de análise de variância de duas vias e regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software SAEG 9.1. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors. Para verificar a homogeneidade das variâncias dos erros entre os tratamentos foi aplicado o teste de Bartlett. Para escolha do modelo de regressão foi considerado a significância dos coeficientes de regressão, a magnitude dos coeficientes de determinação, calculados em função da soma quadrados da regressão/soma quadrados de tratamentos, bem como o comportamento das variáveis em estudo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Desempenho produtivo

Não houve interação significativa entre densidade de estocagem e suplementação de óleo de orégano na dieta, assim como da densidade e do óleo de orégano para as seguintes variáveis de desempenho produtivo: taxa de sobrevivência, consumo de ração, rendimento de carcaça de machos e fêmeas, índice víscerosomático de machos e fêmeas e índice gônadosomático de machos e fêmeas (Tabela 3).

Para ganho de peso e taxa de crescimento específico houve efeito linear decrescente da densidade de estocagem. Para a biomassa final, conversão alimentar e índice hepatossomático houve efeito linear crescente da densidade de estocagem (Tabela 3 e Figuras 1; 2; 3; 4 e 5, respectivamente). Para o índice hepatossomático também houve efeito significativo da suplementação de óleo de orégano, sendo observado o maior valor para os peixes alimentados com a dieta controle (Tabela 3).

#### 3.2. Respostas de Estresse

Não houve interação significativa entre densidade de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta para glicose, lactato sanguíneos e para cortisol plasmático (Tabela 4). Para a glicose houve efeito quadrático da densidade de estocagem, sendo estimado o valor que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup> (Fig. 6). Para o cortisol plasmático houve efeito quadrático da densidade de estocagem, sendo estimado o valor que maximiza essa variável igual a 0,53 peixes L<sup>-1</sup> (Fig. 7).

**Tabela 3**

Desempenho produtivo e índices corporais de *Astyanax altiparanae* cultivados em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

	Efeito da interação densidade e óleo de orégano	Efeito da densidade	Densidade de estocagem (peixes L <sup>-1</sup> )				Efeito do óleo de orégano	Controle (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Óleo de orégano (0,5 g kg <sup>-1</sup> )	CV (%)
			0,17	0,42	0,58	0,75				
TS (%)	ns	ns	93,75	97,00	99,64	98,06	ns	95,88	98,35	5,22
CR (g)	ns	ns	7,10	6,18	6,25	6,35	ns	6,73	6,21	13,29
GP <sup>1</sup> (g)	ns	p=0,003	2,23	1,53	1,35	1,07	ns	1,69	1,41	36,72
BF <sup>2</sup> (g)	ns	p=0,000	52,75	119,87	160,45	198,29	ns	133,42	132,26	13,83
CA <sup>3</sup>	ns	p=0,001	3,40	4,45	4,81	6,65	ns	4,63	5,03	29,60
TCE <sup>4</sup> (% dia <sup>-1</sup> )	ns	p=0,002	0,40	0,30	0,27	0,22	ns	0,32	0,28	28,17
RCf (%)	ns	ns	66,12	67,54	68,44	66,66	ns	67,38	66,98	4,17
RCm (%)	ns	ns	79,22	80,20	79,66	80,05	ns	79,80	79,76	1,55
IVSf (%)	ns	ns	20,84	21,52	20,31	21,59	ns	21,07	21,12	11,39
IVSm (%)	ns	ns	8,17	8,04	8,20	7,93	ns	8,20	7,97	8,90
IGSf (%)	ns	ns	17,05	16,96	15,69	17,20	ns	16,65	16,72	14,80
IGSm (%)	ns	ns	2,88	3,02	2,77	2,54	ns	2,78	2,83	16,46
IHS <sup>5</sup> (%)	ns	p=0,054	0,63	0,72	0,79	0,81	p=0,008	0,76	0,66	13,88

TS – taxa de sobrevivência, CR – consumo de ração, GP – ganho de peso, BF – Biomassa final, CA – conversão alimentar, TCE – taxa de crescimento específico, RCf e RCm – rendimento de carcaça fêmea e macho, respectivamente, IVSf e IVSm – índice viscerossomático fêmea e macho, respectivamente, IGSf e IGSm – índice gonadossomático fêmea e macho, respectivamente, IHS – índice hepatossomático

CV - coeficiente de variação

ns – não significativo pelo teste F ( $p > 0,05$ )

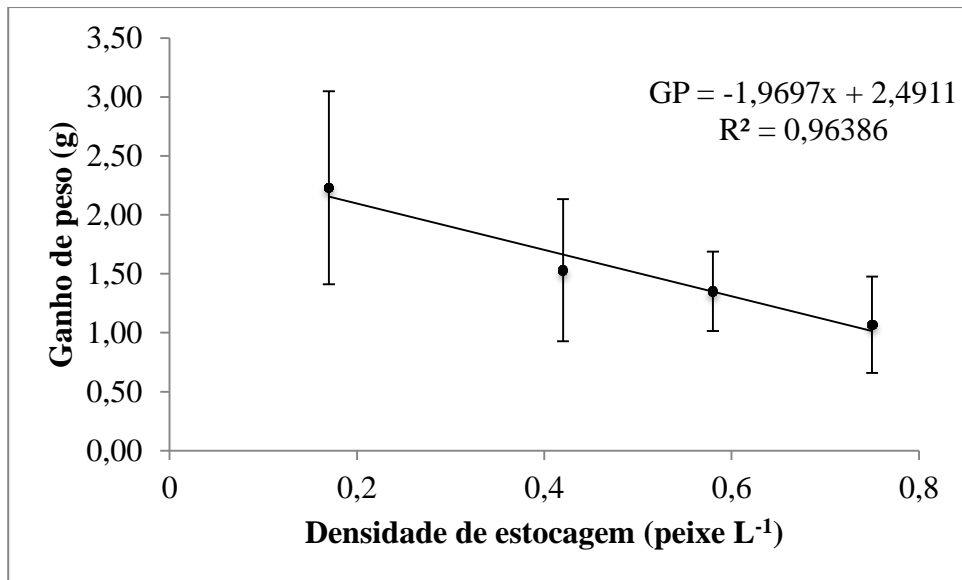
<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y = -1,9697x + 2,4911$  ( $R^2 = 0,96$ )

<sup>2</sup> Efeito linear:  $Y = 252,13x + 11,818$  ( $R^2 = 0,99$ )

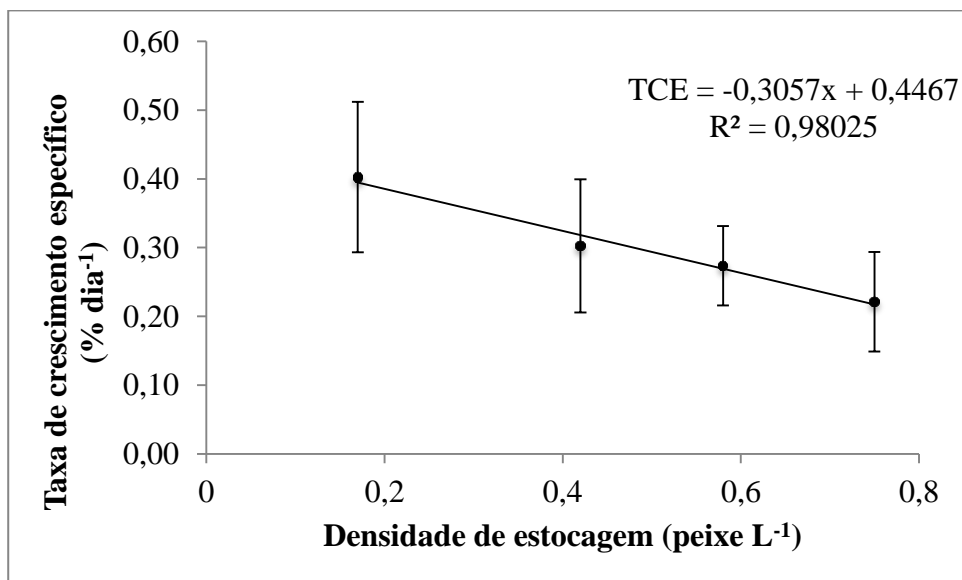
<sup>3</sup> Efeito linear:  $Y = 5,2311x + 2,3153$  ( $R^2 = 0,91$ )

<sup>4</sup> Efeito linear:  $Y = -0,3057x + 0,4467$  ( $R^2 = 0,98$ )

<sup>5</sup> Efeito linear:  $Y = 0,2328x + 0,602$  ( $R^2 = 0,92$ )

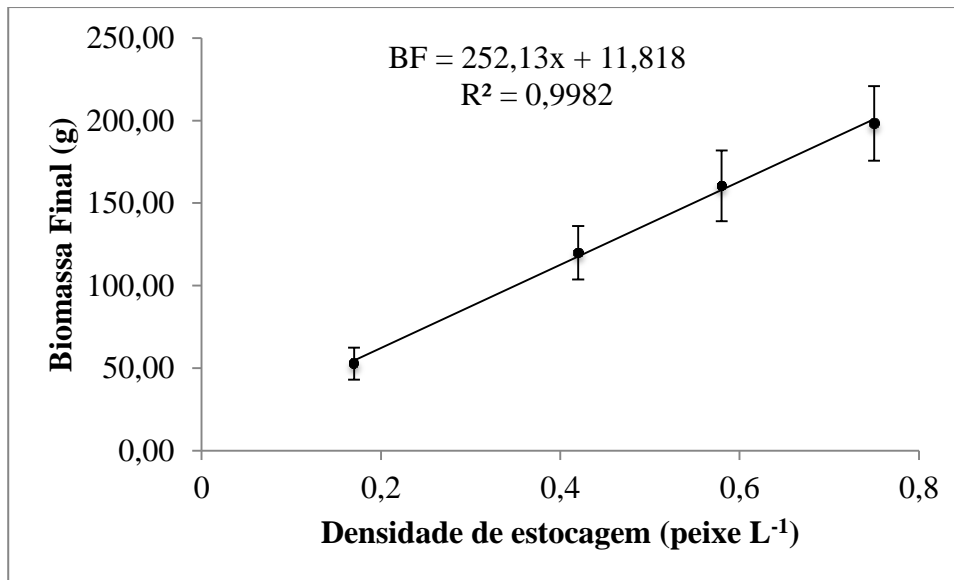


**Fig. 1.** Ganho de peso de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

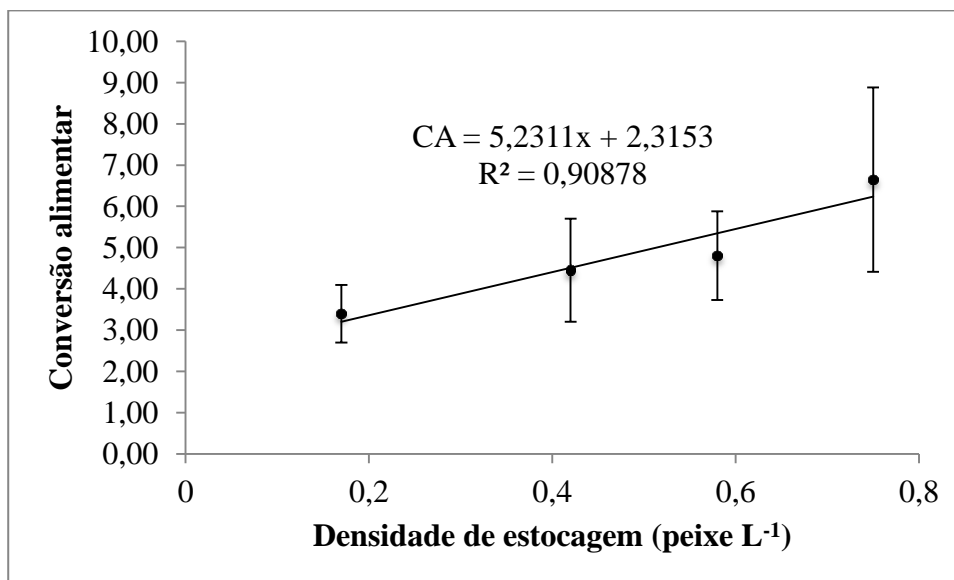


**Fig. 2.** Taxa de crescimento específico de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

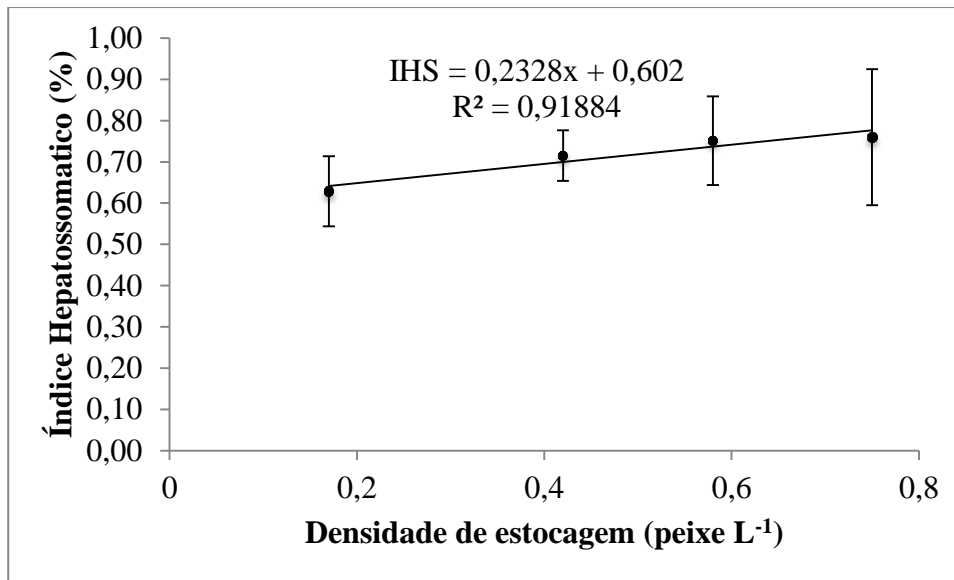




**Fig. 3.** Biomassa final de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig. 4.** Conversão alimentar de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig. 5.** Índice hepatossomático de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

**Tabela 4**

Respostas de estresse de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

	Efeito da interação densidade e óleo de orégano	Efeito da densidade	Densidade de estocagem (peixes L <sup>-1</sup> )				Efeito do óleo de orégano	Controle (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Óleo de orégano (0,5 g kg <sup>-1</sup> )	CV (%)
			0,17	0,42	0,58	0,75				
GLI <sup>1</sup> (mg.dL <sup>-1</sup> )	ns	p=0,027	62,13	60,50	66,86	75,38	ns	69,24	63,19	14,95
LAC (mmol.L <sup>-1</sup> )	ns	ns	3,69	2,50	3,48	3,26	ns	3,19	3,27	29,69
COR <sup>2</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	ns	p=0,004	120,43	192,32	185,13	170,50	ns	176,77	157,42	22,91

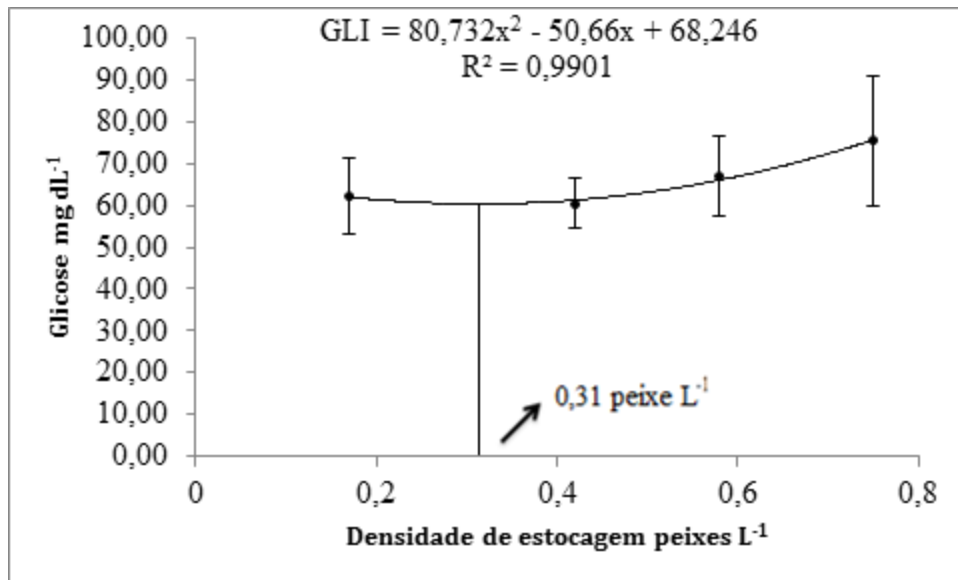
GLI – glicose, LAC – lactato, COR – cortisol

CV - coeficiente de variação

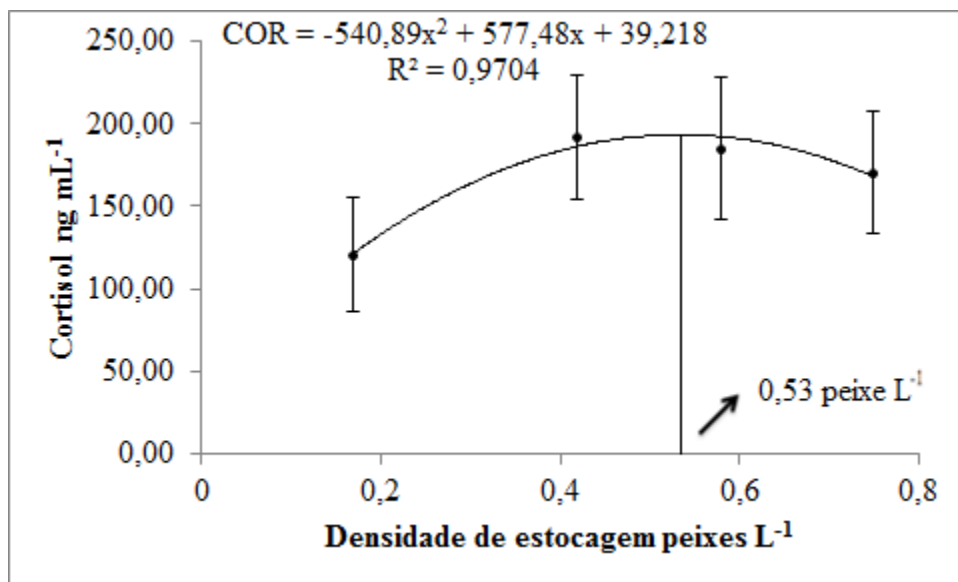
ns – não significativo pelo teste F (p>0,05)

<sup>1</sup> Efeito quadrático:  $Y = 80,732x^2 - 50,66x + 68,246$  ( $R^2 = 0,99$ )

<sup>2</sup> Efeito quadrático:  $Y = -540,89x^2 - 577,48x + 39,218$  ( $R^2 = 0,97$ )



**Fig. 6.** Glicose sanguínea de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig. 7.** Cortisol plasmático de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

### 3.3. Estresse oxidativo

Não houve interação significativa entre a densidade de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta (Tabela 5). Para a concentração de malondialdeído houve efeito linear crescente da densidade de estocagem (Fig. 8) e para a enzima superóxido dismutase houve efeito quadrático da densidade (Fig. 9), com valor estimado que minimiza essa variável igual a 0,57 peixes L<sup>-1</sup>. Para as enzimas catalase e glutathiona-S-transferase não houve efeito significativo da densidade. Para a enzima catalase houve efeito significativo da dieta, com menor valor para os peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano (Tabela 5).

### 3.4. Histopatologia branquial

Não houve interação significativa entre a densidade de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta (Tabela 6). Para o índice de histopatologia das brânquias houve efeito linear crescente da densidade de estocagem (Fig. 10), sendo que as lesões mais comuns foram hipertrofia e hiperplasia do epitélio, deformação da lamela primária, fusão e desorganização da lamela secundária, vacuolização degenerativa e necrose e degenerações celulares. Entretanto, não houve efeito da suplementação do óleo de orégano sobre o índice de histopatologia branquial (Tabela 6).

**Tabela 5**

Estresse oxidativo nas brânquias de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

	Efeito da interação densidade e óleo de orégano	Efeito da densidade	Densidade de estocagem (peixes L <sup>-1</sup> )				Efeito do óleo de orégano	Controle (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Óleo de orégano (0,5 g kg <sup>-1</sup> )	CV (%)
			0,17	0,42	0,58	0,75				
<sup>1</sup> MDA (nmol g <sup>-1</sup> )	ns	p=0,021	0,1096	0,0868	0,08861	0,0898	ns	0,0905	0,0969	74,54
CAT (μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	ns	ns	0,0002	0,0003	0,0007	0,0005	p=0,000	0,0004	0,0005	39,20
GLU (μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	ns	ns	1,9298	1,1406	1,1026	1,5760	ns	1,6705	1,19723	56,21
<sup>2</sup> SOD (U SOD nmol <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	ns	p=0,021	0,0128	0,0161	0,0114	0,0095	ns	0,0206	0,0051	16,56

MDA – malondialdeído, CAT – catalase, GLU – glutatona S – transferase, SOD – superóxido dismutase

CV - coeficiente de variação

ns – não significativo pelo teste F (p>0,05)

<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y = 0,0008x + 0,000005$  ( $R^2 = 0,63$ )

<sup>2</sup> Efeito quadrático:  $Y = 0,1467x^2 - 0,1666 + 0,1332$  ( $R^2 = 0,96$ )

**Tabela 6**

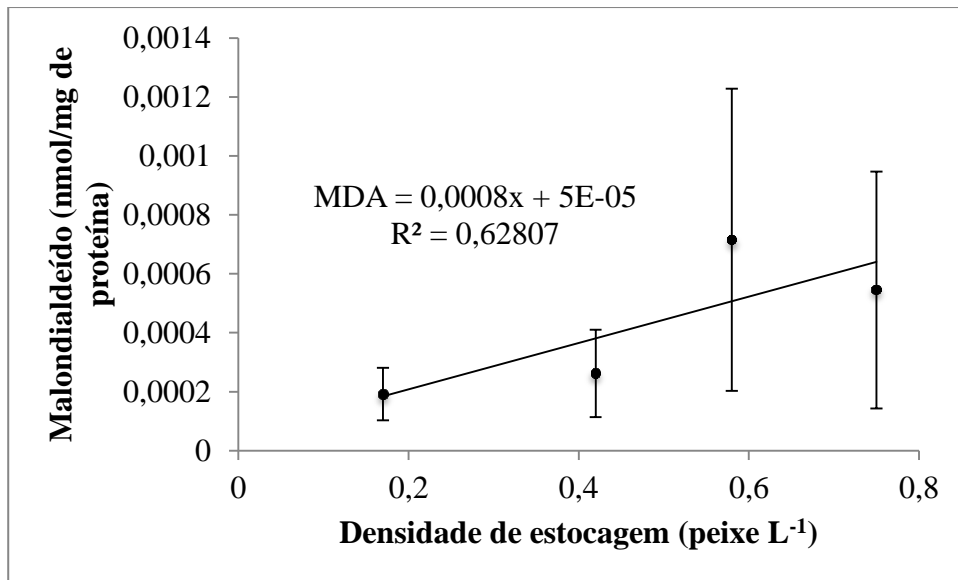
Índice de histopatologia branquial (IHB) em *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

	Efeito da interação densidade e óleo de orégano	Efeito da densidade	Densidade de estocagem (peixes L <sup>-1</sup> )				Efeito do óleo de orégano	Controle (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Óleo de orégano (0,5 g kg <sup>-1</sup> )	CV (%)
			0,17	0,42	0,58	0,75				
IHB	ns	p=0,006	33,88	41,70	44,02	50,00	ns	42,23	42,57	19,36

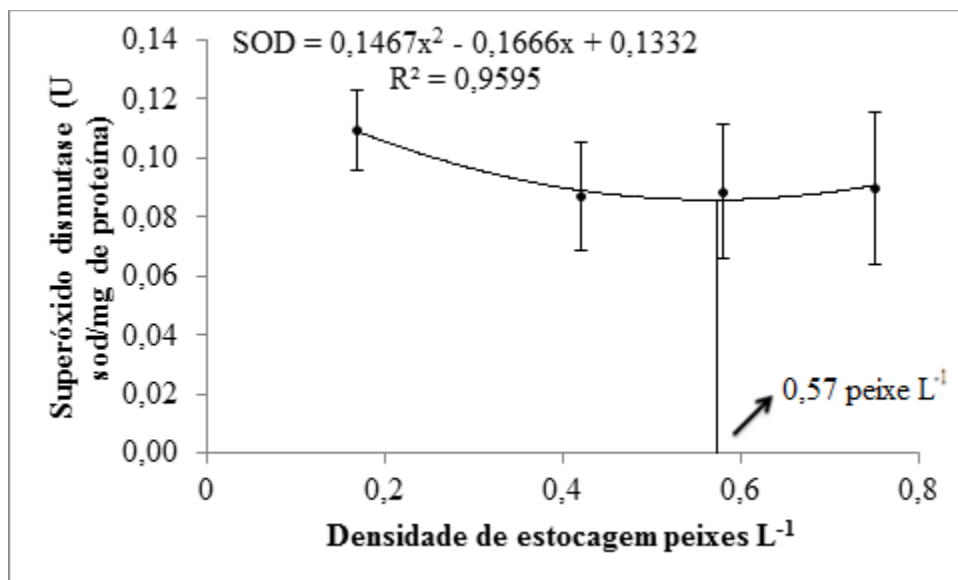
IHB - Índice de histopatologia branquial

CV - coeficiente de variação, ns – não significativo pelo teste F (p>0,05)

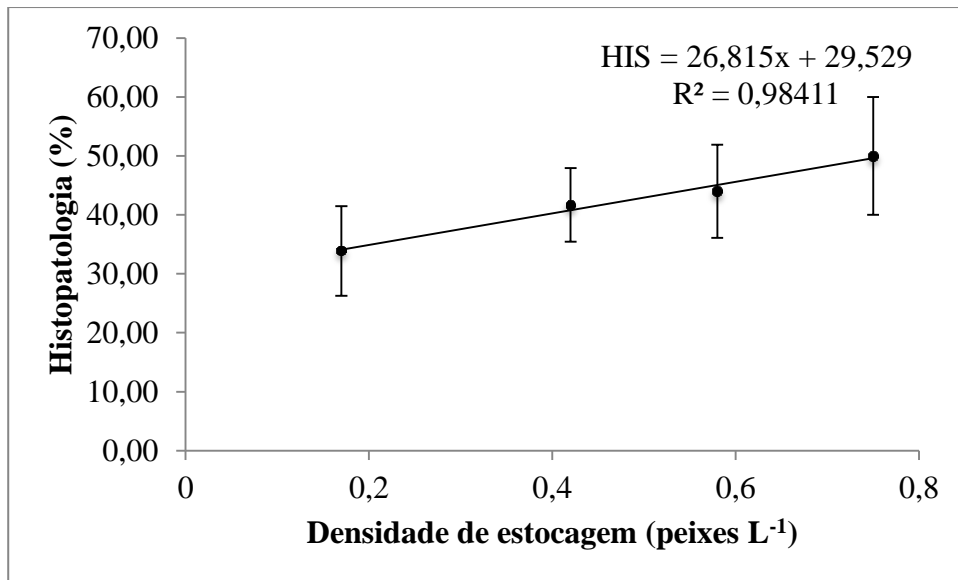
<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y = 26,815x + 29,529$  ( $R^2 = 0,98$ )



**Fig. 8.** Malondialdeído nas brânquias de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig. 9.** Superóxido dismutase nas brânquias de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidade, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig. 10.** Índice de histopatologia branquial (IHB) de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



### 3.5. Qualidade de Água

Não houve interação significativa entre as densidades de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta para o oxigênio dissolvido, pH e nitrito na água, porém, houve efeito da densidade sobre o oxigênio dissolvido, pH e nitrito na água (Tabela 7). Para o oxigênio dissolvido observou-se efeito linear decrescente (Fig. 11), para nitrito, efeito linear crescente (Fig. 12) e para o pH, efeito quadrático (Fig. 13) sendo que 0,62 peixes L<sup>-1</sup> foi a densidade estimada para o menos pH.

Para amônia tóxica houve interação significativa entre densidade de estocagem e a suplementação de óleo de orégano na dieta, bem como efeito da densidade de estocagem e do óleo de orégano na dieta (Tabela 7). Para os peixes alimentados com a dieta controle observou-se efeito quadrático da densidade, com valor estimado que minimiza essa variável igual a 0,31 peixes L<sup>-1</sup> (Fig. 14), enquanto que para os peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano observou-se efeito linear crescente da densidade sobre a amônia tóxica (Fig. 15). A concentração de amônia tóxica na água dos peixes alimentados com a dieta controle foi maior que a dos peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano, na densidade de 0,75 peixes L<sup>-1</sup> (Tabela 8).

**Tabela 7**

Parâmetros de água no cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

	Efeito da interação densidade e óleo de orégano	Efeito da densidade	Densidade de estocagem (peixes L <sup>-1</sup> )				Efeito do óleo de orégano	Controle (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Óleo de orégano (0,5 g kg <sup>-1</sup> )	CV (%)
			0,17	0,42	0,58	0,75				
O <sub>2</sub> <sup>1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	ns	p=0,006	6,58	6,21	6,17	5,90	ns	6,30	6,13	5,47
NI <sup>2</sup> (ppm)	ns	p=0,000	0,02	0,19	0,37	0,39	ns	0,26	0,22	44,88
pH <sup>3</sup>	ns	p=0,000	6,90	6,30	6,26	6,25	ns	6,43	6,42	2,02
AT (mg L <sup>-1</sup> )	p=0,008	p=0,000	0,00069	0,00101	0,00161	0,00286	p=0,002	0,0018	0,0013	28,59

AT – amônia tóxica, NI – nitrito, O<sub>2</sub> – oxigênio dissolvido, T - temperatura

CV - coeficiente de variação

ns – não significativo pelo teste F (p>0,05)

<sup>1</sup> Efeito linear: Y= -1,1011x + 6,7423 (R<sup>2</sup> = 0,96)

<sup>2</sup> Efeito linear: Y= 0,6823x - 0,0866 (R<sup>2</sup> = 0,95)

<sup>3</sup> Efeito quadrático: Y= 3,4291x<sup>2</sup> - 4,2265x + 7,5102 (R<sup>2</sup> = 0,99)

**Tabela 8**

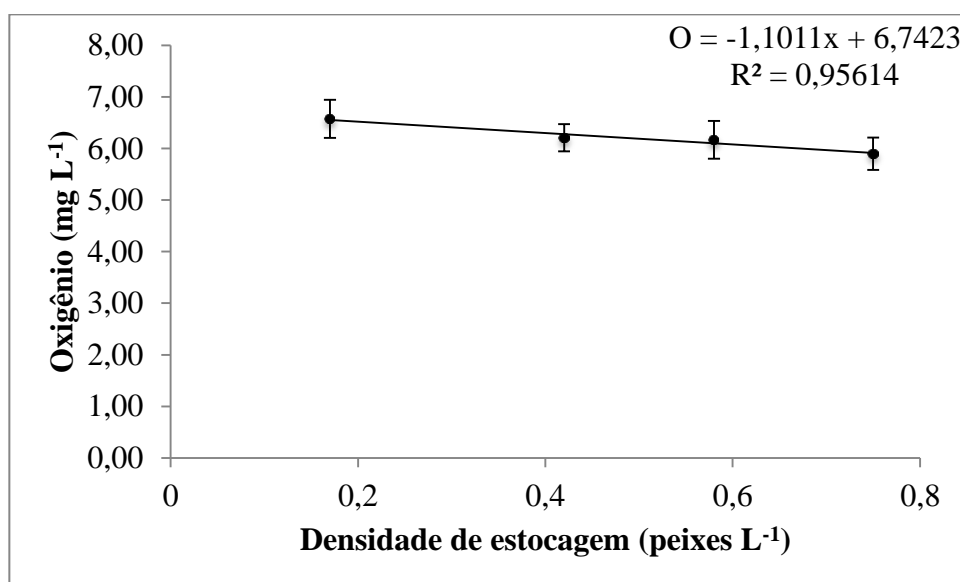
Amônia tóxica na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* cultivados em diferentes densidades, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).

Densidade \ Dieta	Controle <sup>1</sup> (0,0 g kg <sup>-1</sup> )	Orégano <sup>2</sup> (0,5 g kg <sup>-1</sup> )
0,17	0,00096 <sup>a</sup>	0,00042 <sup>a</sup>
0,42	0,00114 <sup>a</sup>	0,00088 <sup>a</sup>
0,58	0,00156 <sup>a</sup>	0,00167 <sup>a</sup>
0,75	0,00363 <sup>a</sup>	0,00210 <sup>b</sup>
	p=0,0000	p=0,0028

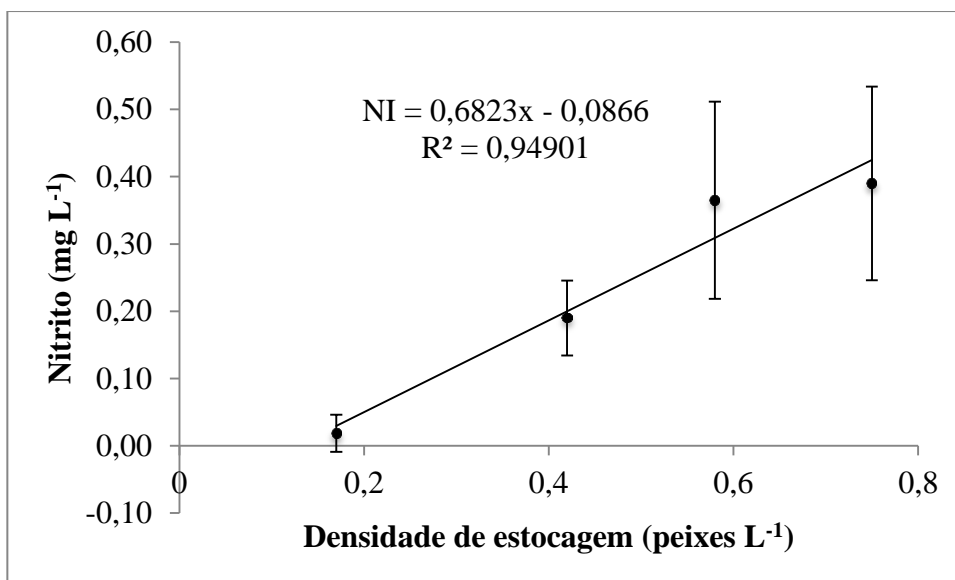
Médias em cada linha, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Amônia<sub>Controle</sub> = 0,0142x<sup>2</sup> - 0,0087x + 0,0021 (R<sup>2</sup> = 0,97)

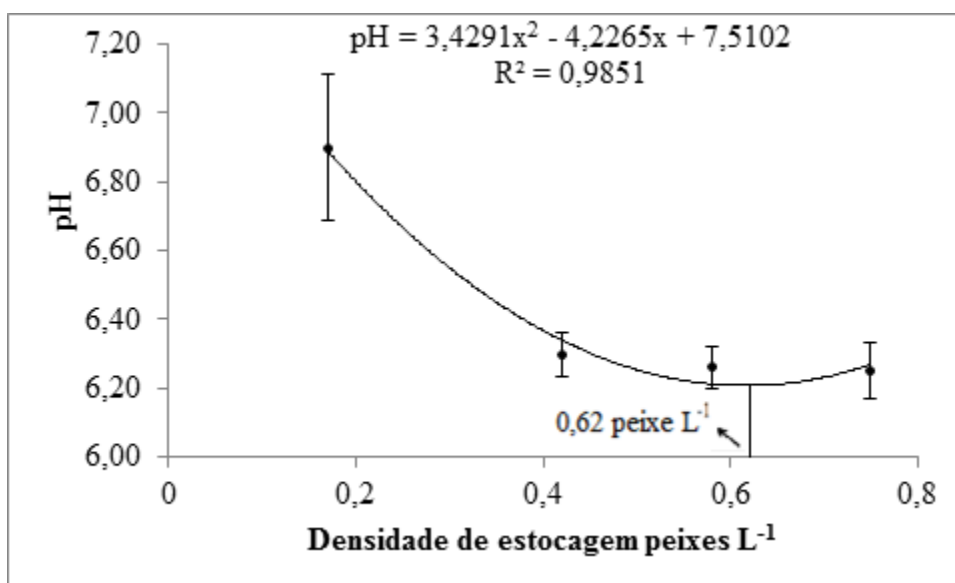
<sup>2</sup> Amônia<sub>Óleo de orégano</sub> = 0,0036x - 0,0002 (R<sup>2</sup> = 0,86)



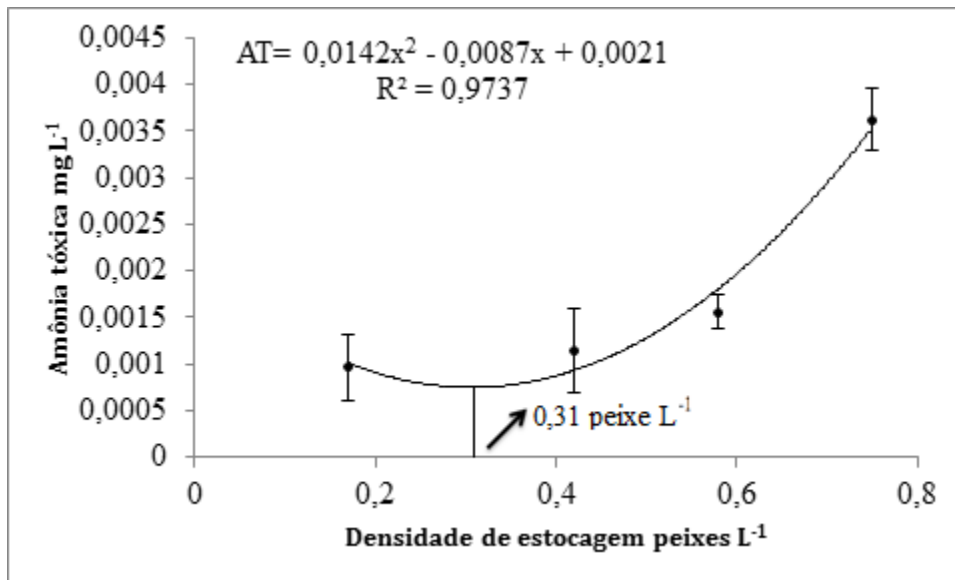
**Fig. 11.** Oxigênio dissolvido na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



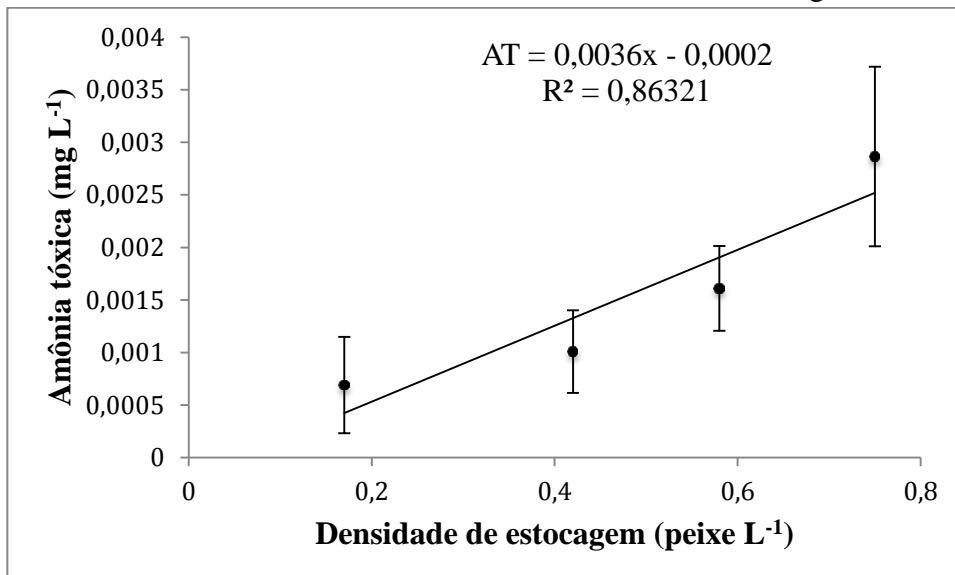
**Fig. 12.** Nitrito na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig 13.** pH na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades de estocagem, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano (0,0 e 0,5 g kg<sup>-1</sup>).



**Fig 14.** Amônia tóxica na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades e alimentados com dieta sem óleo de orégano.



**Fig 15.** Amônia tóxica na água de cultivo de *Astyanax altiparanae* em diferentes densidades e alimentados com dieta com óleo de orégano.

#### 4. Discussão

A redução no crescimento e na eficiência de utilização dos nutrientes da dieta pelos peixes em função do aumento da densidade de estocagem deve estar relacionada com a piora na qualidade da água, principalmente devido ao aumento na concentração de amônia tóxica e de nitrito. Apesar da concentração letal (CL<sub>50</sub>) de amônia tóxica para o *Astyanax altiparanae* ser igual 0,66 mg L<sup>-1</sup> (Martinez et al., 2006), em condições de exposição crônica, níveis de amônia mais baixos podem ser responsáveis pela piora no desempenho produtivo e pelo aumento nas patologias branquiais, como observado no presente estudo e por Lemarie et al. (2004); Li et al. (2014) e Devaraj et al. (2014). Os maiores níveis de amônia tóxica observados na água dos peixes cultivados em densidades mais altas estão coerentes com o aumento do cortisol observado, uma vez que esse hormônio aumenta o turnover proteico e a excreção de amônia em peixes (Mommsen et al. 1999).

Os maiores níveis de glicose e cortisol no sangue dos peixes cultivados em densidades mais altas também podem explicar a redução no desempenho produtivo dos animais. Esses resultados indicam que o aumento na densidade de estocagem provoca estresse em *A. altiparanae*, causando mobilização das reservas energéticas, como observado para *Scophthalmus rhombus* (Herrera et al., 2012) e *Dicentrarchus labrax* (Poltronieri et al., 2009). Entretanto, a suplementação de óleo de orégano não resultou em maior resistência ao estresse causado pela densidade de estocagem.

O aumento no peso do fígado (IHS) dos peixes cultivados em densidades mais altas provavelmente está relacionado com alterações patológicas, como o acúmulo de gordura. Esse efeito possivelmente está relacionado com o maior nível de cortisol plasmático observado, uma vez que Targher et al. (2006) sugerem que o fígado gorduroso pode ser causado pela super estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, o que levaria a produção aumentada de cortisol. Como o cortisol promove redução do glicogênio hepático em peixes (Vijayan et al., 1991; Vijayan et al., 1997), o aumento no índice hepatossomático não poderia ser explicado pela maior deposição de glicogênio, reforçando a hipótese de acúmulo de gordura. O menor índice hepatossomático nos peixes alimentados com a dieta

suplementada com óleo de orégano indica que o orégano tem atividade protetora do fígado, como observado para ratos (Alam et al., 1999; Aristatile et al., 2009).

O menor nível de amônia tóxica na água dos peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano deve estar relacionado com sua ação positiva na deposição de proteína na carcaça, como observado por Ferreira et al. (2014) para a mesma espécie, e consequente redução na excreção de nitrogênio pelos peixes. Assim, a suplementação de orégano na dieta permite a utilização de densidades de estocagem maiores na criação de *A. altiparanae*, uma vez que a concentração de amônia tóxica na água na densidade mais alta (0,75 peixes L<sup>-1</sup>) foi menor para os peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano.

A redução do oxigênio dissolvido na água com o aumento na densidade de estocagem está coerente com o maior consumo de oxigênio devido a maior biomassa de peixes respirando. Além disso, a redução no pH da água também deve estar relacionada com a maior biomassa de peixes respirando, com aumento na excreção de dióxido de carbono (Soarez et al., 2008) e, conseqüentemente, maior concentração de H<sup>+</sup> na água (Santos et al., 2010; Sammouth et al., 2009). Apesar do efeito da densidade sobre o oxigênio dissolvido e o pH da água, os valores observados no presente estudo estão adequados para o cultivo de peixes (Boyd, 1982)

O aumento nos níveis do produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído, em função do aumento na densidade de estocagem reflete a condição de estresse a que os peixes foram submetidos. Em condições de estresse ocorre aumento no débito cardíaco, na taxa de ventilação branquial, na perfusão sanguínea das brânquias e no metabolismo (Correa et al., 2006; Wendelaar Bonga, 2011). Nessas condições ocorrem perturbações no equilíbrio do oxigênio sistêmico (Pörtner, 2001; Pörtner & Knust, 2007) e acúmulo de substâncias indicadoras de estresse oxidativo (Abele et al., 1998; Flanagan et al., 1998; Heise et al., 2003; Heise et al., 2006; Keller et al., 2004). A redução na atividade da enzima superóxido dismutase indica que o aumento da densidade também prejudicou os mecanismos de compensação endógenos, comprometendo as defesas antioxidantes dos peixes. A ausência de efeito da dieta (com ou sem óleo de orégano) sobre o produto da peroxidação lipídica, o

malondialdeído, e a menor atividade da enzima catalase nas brânquias dos peixes alimentados com a dieta suplementada com óleo de orégano mostra que a atividade antioxidante do orégano (Simitzis et al., 2008; Alma et al., 2003) permitiu poupar a ativação dessa enzima, uma vez que o óleo de orégano tem grande capacidade de neutralizar radicais livres (Bozin et al. 2006).

O aumento na densidade de estocagem em sistema estático promove aumento na biomassa final, porém há redução no peso médio dos peixes e aumento das respostas de estresse. Como a maior concentração estimada de cortisol no plasma dos peixes foi observada na densidade de 0,53 peixes L<sup>-1</sup>, o *A. altiparanae* deve ser cultivado em densidades menores que esse valor. Os resultados de qualidade de água (amônia tóxica) e da concentração de glicose sanguíneo indicam que a melhor densidade de estocagem para essa espécie é de 0,31 peixes L<sup>-1</sup>.

## **5. Conclusões**

As mais altas densidades de estocagem utilizadas comprometem o desempenho produtivo, o bem estar e a integridade branquial de *Astyanax altiparanae*.

O óleo de orégano não atua como modulador das respostas de estresse, porém, atua no metabolismo do nitrogênio, com menor excreção de amônia em *Astyanax altiparanae*.



## 6. Referências

- Abei H (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, **105**, 121-126.
- Abele D, Burlando B, Viarengo A, Pörtner H-O (1998) Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **120**, 425-435.
- Alam K, Nagi MN, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM (1999) The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Pharmacological research*, **40**, 159-163.
- Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T (2003) Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **26**, 1725-1729.
- Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV (2009) Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundamental & clinical pharmacology*, **23**, 757-765.
- Ashley PJ (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, **104**, 199-235.
- Azuma Y, Ozasa N, Ueda Y, Takagi N (1986) Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *Journal of dental research*, **65**, 53-56.
- Baldisserotto B (2009) *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*, segunda edição, Rio Grande do Sul.
- Bampidis VA, Christodoulou V, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB, Chatzopoulou PS (2005) Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal feed science and technology*, **121**, 285-295.
- Boyd, C. E. (1982). *Water quality management for pond fish culture*. Amsterdam: Elsevier Science, 1982. 317p
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**(5), 1822-1828.
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 302-310.
- Burt SA, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, **36**, 162-167.
- Cabuk M, Alcicek A, Bozkurt M, Imre N (2003) Antimicrobial properties of the essential oils isolated from aromatic plants and using possibility as alternative feed additives. II. In: National Animal Nutrition Congress, pp. 18-20.
- Campelo DAV, Oliveira KRB, Batiston WP, Zuanon JAS, Furuya WM, Matsushita M, Salaro AL (2014) Conjugated linoleic acid in diets for lambari (*Astyanax altiparanae*)(Garutti & Britski, 2000). *Aquaculture Nutrition*.

- Correa L, Pimentel L, Cerqueira R, Chemim D (2006) Estresse em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução*, **30**, 113-117.
- Costa AB (2003) Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Universidade de São Paulo.
- Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, Cabral LS, Pina DS, Ladeira MM, Azevedo JAG (2012) Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema.
- Devaraj S, Arulprakasam C, Kandhan AP, Neelamegam K, Kalaiselvan R (2014) Toxicological effects of ammonia on gills of *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linn.). *Journal of Coastal Life Medicine*, **2**, 94-98.
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2000) Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, **101**, 33-39.
- Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Porter M, Gadd D (2002) The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, **61**, 493-531.
- Ferreira PMF, Nascimento LS, Dias DC, Moreira DMV, Salaro AL, Freitas MBD, Carneiro APS, Zuanon JAS (2014) Essential Oregano Oil as a Growth Promoter for the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **45**, 28-34.
- Flanagan SW, Moseley PL, Buettner GR (1998) Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS letters*, **431**, 285-286.
- Force M, Sparks WS, Ronzio RA (2000) Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytotherapy Research*, **14**, 213-214.
- Fukayama EH, Bertechini AG, Geraldo A, Kato RK, Murgas LDS (2004) Extrato de orégano como aditivo em rações de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **6**, 2316-2326.
- Gonçalves LU, Parisi G, Bonelli A, Sussel FR, Viegas EMM (2014) The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*)(Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquaculture Research*, **45**, 195-203.
- Gornati R, Papis E, Rimoldi S, Terova G, Saroglia M, Bernardini G (2004) Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, **341**, 111-118.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, **249**, 7130-7139.
- Hasan MM, Faruk MAR, Anka IZ, Azad MAK (2014) Investigation on fish health and diseases in rural pond aquaculture in three districts of Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, **11**, 377-384.
- Heise K, Puntarulo S, Nikinmaa M, Lucassen M, Pörtner H-O, Abele D (2006) Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **143**, 494-503.

- Heise K, Puntarulo S, Pörtner H-O, Abele D (2003) Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **134**, 79-90.
- Helrich KC (1990) Official methods of Analysis of the AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc, **2**.
- Herrera M, Ruiz-Jarabo I, Hachero I, Vargas-Chacoff L, Amo A, Mancera JM (2012) Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquaculture International*, **20**, 1041-1052.
- Irwin S, O'Halloran J, FitzGerald RD (1999) Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*, **178**, 77-88.
- Keller M, Sommer AM, Pörtner HO, Abele D (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *Journal of experimental biology*, **207**, 2529-2538.
- Lemarie G, Dosdat A, Covès D, Dutto G, Gasset E, Person-Le Ruyet J (2004) Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, **229**, 479-491.
- Leonardo AFG, Baccarin AE (2014) Desempenho produtivo de tilápias do nilo criadas em tanques rede. *B. Industr. Anim.*, **71**, 256-261.
- Li M, Yu N, Qin JG, Li E, Du Z, Chen L (2014) Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. *Fish & shellfish immunology*, **38**, 158-165.
- Martinez, C. B. d. R., Azevedo, F., & Winkler, E. U. (2006). Toxicidade e efeitos da amônia em peixes Neotropicais.
- Mehrim AI (2009) Effect of dietary supplementation of Biogen®(Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. *J Fish Aquat Sci*, **4**, 261-273.
- Miranda ECd, Pezzato AC, Pezzato LE, Furuya WM (2000) Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, **22**, 669-675.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **9**(3), 211-268.
- Montero D, Izquierdo MS, Tort L, Robaina L, Vergara JM (1999) High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in Gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, **20**, 53-60.
- Pezzato LE, Miranda ECd, Barros MM, Pinto LGQ, Furuya WM, Pezzato AC (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, **31**, 1595-1604.
- Poltronieri C, Laurà R, Bertotto D, Negrato E, Simontacchi C, Guerrera MC, Radaelli G (2009) Effects of exposure to overcrowding on rodlet cells of the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.). *Veterinary research communications*, **33**, 619-629.

- Pörtner H (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, **88**, 137-146.
- Pörtner HO, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *science*, **315**, 95-97.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F (2010) Híbridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*, 589-606.
- Pouey J, Piedras SRN, Rocha CB, Tavares RA, Santos JDM, Britto ACP (2011) productive performance of silver catfish, *Rhamdia quelen*, juveniles stocked at different densities/Desempenho produtivo de juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes densidades de estocagem. *Ars Veterinaria*, **27**, 241-245.
- Ricker, W. E. 11 Growth Rates and Models." *Fish physiology* 8 (1979): 677-743.
- Sammouth S, d'Orbcastel ER, Gasset E, Lemarié G, Breuil G, Marino G, Coeurdacier J-L, Fivelstad S, Blancheton J-P (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*, **40**, 72-78.
- Santos GA, Schrama JW, Mamauag REP, Rombout J, Verreth JAJ (2010) Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): the combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture*, **299**, 73-80.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 275-280.
- Segner H, Sundh H, Buchmann K, Douxfils J, Sundell KS, Mathieu C, Ruane N, Jutfelt F, Toften H, Vaughan L (2012) Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish physiology and biochemistry*, **38**, 85-105.
- Simitzis PE, Deligeorgis SG, Bizelis JA, Dardamani A, Theodosiou I, Fegeros K (2008) Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, **79**, 217-223.
- Soares, C. M., Hayashi, C., Meurer, F., & Schamber, C. R. (2008). Efeito da densidade de estocagem do quinguio, *Carassius auratus* L., 1758 (Osteichthyes, Cyprinidae), em suas fases iniciais de desenvolvimento. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **24**, 527-532.
- Souza-Filho JJd, Cerqueira VR (2003) Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. *Pesquisa agropecuária brasileira*, **38**, 1317-1322.
- Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Falezza G (2006) Associations between liver histology and cortisol secretion in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical endocrinology*, **64**, 337-341.
- Vazzana M, Cammarata M, Cooper EL, Parrinello N (2002) Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, **210**, 231-243.

- Vijayan MM, Ballantyne JS, Leatherland JF (1991) Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and comparative endocrinology*, **82**, 476-486.
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997) Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **116**, 89-95.
- Wendelaar Bonga SE (2011) Hormonal responses to stress. *Encyclopedia of fish physiology*. Academic Press, San Diego, 1515-1523.
- Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, Zhou XH, Xiang X, Wang KY (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.

## Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

*Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3899.2262 – Fax: (31) 3899.2275 – e-mail: dzo@ufv.br*

Comitê de Ética para Uso de Animais/DZO

Viçosa, 4 de setembro de 2012

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética para Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa certifica que o **processo nº 31/2012**, intitulado “**Óleo essencial de orégano como promotor de crescimento para lambaris-do-rabo-amarelo (Astyanax altiparanae)**”, coordenado pelo **Prof(a). Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por este Comitê em **04/Set/2012**.

### CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use of Animal Science Department/Universidade Federal de Viçosa certify that the **process number 31/2012**, named “**Oregano essential oil as a growth promoter for the lambari-do-rabo-amarelo (Astyanax altiparanae)**”, coordinated by **Prof(a). Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Committee approved this process on **Sep, 4th, 2012**.

\_\_\_\_\_  
Marcos Inácio Marcondes  
Presidente do CEUA/DZO/UFV