

MARIA TATIANA SOARES MARTINS

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA C E DO ÓLEO DE ORÉGANO
(*Origanum vulgare*) EM *Astyanax aff. bimaculatus* EXPOSTOS AO AR**

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
2018

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

T

M386a
2018
Martins, Maria Tatiana Soares, 1987-
Ação antioxidante da vitamina C e do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao ar / Maria Tatiana Soares Martins. – Viçosa, MG, 2018.
xiv, 53 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Peixes. 2. Stresse oxidativo. 3. Antioxidantes. 4. Óleo de orégano. 5. Vitamina C. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597

MARIA TATIANA SOARES MARTINS

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA C E DO ÓLEO DE ORÉGANO
(*Origanum vulgare*) EM *Astyanax aff. bimaculatus* EXPOSTOS AO AR**

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: 08 de maio de 2018.

Juraci Alves de Oliveira

Pollyanna de Moraes França Ferreira
(Coorientadora)

Jener Alexandre Sampaio Zuanon
(Orientador)

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

A Deus, pela vida e saúde.

*A minha mãe **Sebastiana**, pelo apoio e ajuda.*

*Ao meu irmão **Juliano** e minha cunhada **Roberta**, por estarem sempre na torcida.*

*As minhas sobrinhas **Iasmim** e **Isabela**, pelos momentos de alegria. Titia ama vocês.*

*Ao meu **orientador**, por me mostrar os primeiros passos para a vida acadêmica.*

*Aos **animais**, que me inspiram desde criança.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa** e ao **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, pela oportunidade de cursar o mestrado.

A **Fundação de Amparo À pesquisa de MG (FAPEMIG)**, pelo financiamento do projeto de pesquisa que originou esta dissertação. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa durante a realização deste curso.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, por confiar no meu trabalho e se dedicar junto a mim, a esta dissertação. Gratidão Jener por entender as minhas limitações, por esclarecer as minhas dúvidas com tanta paciência, mesmo que elas fossem tão triviais para você. Gratidão por mesmo com os seus diversos compromissos como professor/pesquisador, ter cumprido tão bem o seu papel como orientador. Gratidão por ter me ajudado em diversas questões além do mestrado. Houve momentos muito difíceis durante esta caminhada, e foi graças a você que jamais pensei em desistir, porque eu sabia que podia contar com você para o que precisasse. Eu não podia ter escolhido melhor orientador. Espero levar comigo um pouco da pessoa, professor, pesquisador que você é, e compartilhar com outras pessoas.

A minha coorientadora **Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Salaro**, por disponibilizar o setor de piscicultura (DBA/UFV) para a realização das rações experimentais e por estar disponível para o que eu precisasse.

A minha coorientadora **Dr^a. Pollyanna de Moraes França Ferreira**, pela amizade desde a minha graduação e por me ensinar a desenvolver experimentos com peixes. Suas contribuições foram muito importantes para que eu pudesse desenvolver o experimento deste trabalho sem muitas dificuldades. Agradeço também pela ajuda nas análises de estresse oxidativo e por me esclarecer as dúvidas que surgiram ao longo dessa trajetória.

A **Prof^a. Dr^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira**, pela disponibilização do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFV) e pela doação de reagentes para as análises de enzimas digestivas. Estas análises não se encontram nessa dissertação, mas farão parte de outro artigo. Independente das análises agradeço a equipe do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, em especial a **Dr^a. Roberta Coura**

e aos estudantes de doutorado, **Juan Diego** e **Verônica Faustino** por me proporcionarem uma vivência maravilhosa no laboratório. Vocês são exemplos de equipe organizada e unida.

A **Profª. Drª. Mariella Bontempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal (UFV) e pela doação de alguns reagentes para as análises de estresse oxidativo.

Aos **professores** que tive no mestrado, por todo conhecimento compartilhado.

A **Drª. Jerusa de Oliveira** e à estudante de graduação **Renata Freitas** pelas orientações nas análises de estresse oxidativo.

A **Drª. Suellen Silva Condessa**, por iniciar este trabalho e assim, contribuir para que eu pudesse dar continuidade. Suellen, você é exemplo de pessoa justa e equilibrada, foi um prazer trabalhar com você.

As mestres **Sendy Moreira Reis** e **Isabel Gertrudes Arrigui de Araújo Neves** pela amizade e pela oportunidade de trabalhar e aprender com vocês desde a minha graduação.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (UFV) **Adnilson Brasileiro**, por esclarecer minhas dúvidas sempre com muita paciência. Aos funcionários do departamento de Biologia Animal (UFV) **Nilo Sérgio de Souza** e **Lúcia Helena Campos**, pelos materiais fornecidos e por me atenderem sempre com simpatia.

Aos alunos de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (DBA/UFV), **André Iadeira**, **André Modesto** e **Evaristo Aleman** pela ajuda no desmonte do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura (LAFAP), **Alex Júnio**, **Davi Falashi**, **Débora Werneck**, **Felipe Martins**, **Filipe Azevedo**, **Jheneze Rocha**, **Juliana Rodrigues**, **Karina Boechat**, **Luana Belique**, **Matheus Grossi**, **Suêmea Costa** e **Wanderson Valente**, por toda a ajuda concedida na execução deste trabalho, principalmente no desmonte do experimento, o momento mais cansativo e estressante. É impossível desenvolver qualquer pesquisa sem a ajuda do outro, e essa não seria diferente. Gratidão. A Vocês, meus agradecimentos vão além das contribuições para este trabalho, agradeço pela amizade, pelos momentos de risadas e descontração, dentro e fora do laboratório.

A equipe LAFAP, agradeço em especial ao **Felipe Martins, Filipe Azevedo, Juliana Rodrigues e Suêmea Costa** que se envolveram mais neste trabalho e me ajudaram, dentre outros, nas análises laboratoriais. Agradeço também ao **Wanderson Valente**, que mesmo envolvido em outros trabalhos, sempre foi muito proativo e esteve disponível para me ajudar. Ao **Alex Júnio** também vai meu agradecimento especial por ter contribuído em todas as fases deste trabalho. Gratidão Alex, por me ajudar desde a montagem da estrutura do experimento às análises estatísticas, gratidão pelas dicas que contribuíram para melhorar este trabalho, por me responder tantas dúvidas, especialmente as estatísticas e por me apresentar várias ferramentas do excel e do word. Wanderson e Alex, a amizade de vocês foi um presente que o mestrado me deu. Juntos, trabalhamos, estudamos, viajamos, festejamos, choramos, rimos e dançamos na chuva. Tudo isso fez com que esta caminhada se tornasse menos árdua. Seja qual for nosso destino, que nunca existam barreiras para que possamos nos reencontrar.

A minha mãe **Sebastiana** por me apoiar, acreditar, investir e feito tudo que foi possível para que eu pudesse chegar até aqui, mesmo sem entender bem a minha realidade.

Aos meus tios **Jovita e Sérgio** por me fazerem acreditar que eu poderia cursar graduação em uma Universidade Federal. Graças a isso, hoje estou escrevendo esta dissertação.

As minhas amigas **Efigênia e Jaqueline**, minhas irmãs de coração, pelas palavras de consolo e por sempre me ouvirem quando precisei.

Ao maravilhoso **Deus** pela vida e saúde para que eu pudesse acordar todos os dias para desenvolver o meu trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Gratidão.

BIOGRAFIA

MARIA TATIANA SOARES MARTINS nasceu 06 de novembro de 1987 em Viçosa - MG, Brasil. Filha de Sebastiana Soares Martins Derzil.

Em dezembro de 2005, concluiu o ensino médio pela Escola Estadual “Effie Rolfs”, Viçosa - MG, Brasil.

Em dezembro de 2008, concluiu o curso profissional de Técnico em Meio ambiente pela Escola Técnica de Viçosa (ETEV), Viçosa - MG, Brasil.

Em janeiro de 2016 graduou em licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em março de 2016 ingressou no programa de Pós Graduação em Biologia Animal, nível mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 08 de maio de 2018.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura.....	2
1. Introdução.....	3
2. Vitamina C.....	3
3. Estresse oxidativo e vitamina C.....	7
4. Óleo de orégano em dietas para peixes.....	10
5. Referências bibliográficas.....	14
CAPÍTULO 2: Efeito sinérgico da vitamina C e do óleo de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) contra estresse oxidativo em <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> expostos ao ar.....	26
1. Introdução.....	28
2. Material e métodos.....	29
2.1. Animais, dietas e condições experimentais.....	29
2.2. Estresse oxidativo.....	33
2.3. Análise de glicose sanguínea.....	35
2.4. Análises estatísticas.....	35
3. Resultados.....	36
3.1. Variáveis de estresse oxidativo antes do desafio pela exposição ao ar.....	36
3.2. Variáveis de estresse oxidativo após o desafio pela exposição ao ar.....	41
3.3 Análise de glicose sanguínea.....	41
4. Discussão.....	47
5. Referências bibliográficas.....	50
ANEXO I.....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Pág.
Tabela 1: Formulação e composição química da ração basal.....	31
Tabela 2: Composição química do óleo de orégano fornecida pelo fabricante (LASZLO®).....	32
Tabela 3 - Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.....	37
Tabela 4 - Valores médios das variáveis de estresse oxidativo no fígado de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.....	39
Tabela 5 - Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio.....	42
Tabela 6 - Efeito da interação entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano sobre o malondialdeído (MDA) (valores médios) nas brânquias de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> , submetidos ao desafio.....	43
Tabela 7 - Valores médios de glicose sanguínea e das variáveis de estresse oxidativo no fígado de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio.....	44
Tabela 8 - Efeito da interação entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano sobre a atividade da glutathione S-transferase (GST) (valores médios) no fígado de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> , submetidos ao desafio.....	45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Pág.
Fig. 1: Diferentes formas do ácido ascórbico.....	4
Fig. 2: Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e as principais defesas enzimáticas e não enzimáticas das células.....	9
Fig. 3: Padrão proposto de formação de ROS durante o aumento da exposição à hipóxia (levando à anoxia) em animais que apresentam ativação de defesa antioxidante induzida por hipóxia.....	13
CAPÍTULO 2	
Fig. 1 - Efeito da vitamina C sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	38
Fig. 2 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído – MDA (A) e da enzima catalase – CAT (B) (valores médios \pm desvio padrão), no fígado de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	40
Fig. 3 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído (MDA) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com 1000,0 mg kg ⁻¹ de óleo de orégano, submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	43
Fig. 4 - Efeito da vitamina C sobre a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) (valores médios \pm desvio padrão) no fígado de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com 0,0 mg kg ⁻¹ (A) e 1000,0 mg kg ⁻¹ (B) de óleo de orégano, submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	45
Fig. 5 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído – MDA (A), a proteína carbonilada – PC (B) e a atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (C), catalase – CAT (D) (valores médios \pm desvio padrão), no fígado de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	46
Fig. 6 - Efeito da vitamina C sobre a glicose sanguínea (valores médios \pm desvio padrão) de juvenis de <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio por exposição ao ar.....	46

RESUMO

MARTINS, Maria Tatiana Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2018. **Ação antioxidante da vitamina C e do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao ar.** Orientador: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Coorientadoras: Ana Lúcia Salaro e Pollyanna de Moraes França Ferreira.

A exposição ao ar desencadeia respostas de estresse e estresse oxidativo nos peixes. Quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) supera a sua neutralização pelas defesas enzimáticas e não enzimáticas ocorrem danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Dentre os antioxidantes com potencial para reduzir esses danos destacam-se a vitamina C, antioxidante hidrossolúvel, e o óleo orégano, antioxidante lipossolúvel. A combinação de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis pode promover efeitos sinérgicos na proteção contra danos oxidativos por atuarem em diferentes partes das células. Assim, objetivamos avaliar a interação entre vitamina C e óleo de orégano na capacidade antioxidante de *Astyanax aff. bimaculatus* submetidos à exposição ao ar. Utilizamos esquema fatorial 5x2 em delineamento inteiramente casualizado, com cinco níveis de inclusão de vitamina C (0,0; 40,0; 80,0; 120,0 e 160,0 mg kg⁻¹) e dois níveis de inclusão de óleo de orégano na dieta (0,0 e 1000,0 mg kg⁻¹) com três repetições por tratamento. Foram avaliadas a glicose sanguínea nos peixes expostos ao ar, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e os níveis de malondialdéido (MDA) e de proteína carbonilada (PC) nas brânquias e no fígado dos peixes não expostos e expostos ao ar. Nos peixes não expostos ao ar, não houve interação significativa entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano sobre as variáveis de estresse oxidativo nas brânquias e no fígado. Nesses peixes, a vitamina C reduziu a atividade da SOD e o orégano reduziu os níveis de PC nas brânquias. No fígado, a vitamina C reduziu a atividade da CAT e os níveis de MDA, e o orégano reduziu os níveis de MDA e aumentou a atividade da GST. Nas brânquias dos peixes expostos ao ar, houve interação significativa entre a vitamina C e o óleo de orégano sobre os níveis de MDA. A vitamina C reduziu os níveis de MDA apenas na presença do orégano. No fígado dos peixes expostos ao ar, houve interação significativa entre a vitamina C e o óleo de orégano sobre a atividade da GST. Na ausência do óleo de orégano houve efeito quadrático da vitamina C sobre a atividade da GST, com valor estimado que maximiza essa variável de 98,6 mg kg⁻¹ de vitamina C. Já na presença do orégano, houve efeito cúbico da vitamina C sobre a atividade da GST. No fígado dos peixes expostos ao ar, houve efeito quadrático da vitamina C sobre a

atividade da SOD e os níveis de PC, com valores estimados que minimizam essas variáveis de 135,5 e 91,3 mg kg⁻¹ de vitamina C, respectivamente. A vitamina C também reduziu a atividade da CAT e os níveis de MDA no fígado dos peixes expostos ao ar. A vitamina C reduziu os níveis de glicose sanguínea nos peixes expostos ao ar. Portanto, a vitamina C e o orégano protegeram os peixes contra o estresse oxidativo tanto antes quanto após a exposição ao ar. O efeito sinérgico observado após a exposição ao ar indica a importância da suplementação de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis em dietas para peixes em cultivo. As maiores concentrações de vitamina C avaliadas promoveram maior proteção contra os danos oxidativos nas brânquias e no fígado de *A. aff bimaculatus*. Assim, recomendamos a utilização de 160,0 mg kg⁻¹ de vitamina C. O óleo de orégano apresentou efeito complementar ao da vitamina C na proteção contra os danos oxidativo e, portanto, recomendamos a utilização de 1000,0 mg kg⁻¹ de óleo de orégano associada à suplementação de vitamina C. Em condições de desafio, a combinação dos dois antioxidantes é ainda mais importante devido ao efeito sinérgico desses antioxidantes.

ABSTRACT

MARTINS, Maria Tatiana Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. **Antioxidant action of vitamin C and oregano oil (*Origanum vulgare*) on air exposed.** Adviser: Jener Alexandre Sampaio Zuanon. Co-advisers: Ana Lúcia Salaro and Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Air exposure causes stress responses and oxidative stress in fish. When the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) exceeds their neutralization by enzymatic and non-enzymatic defenses, damage to lipids, proteins and nucleic acids occurs. Among the antioxidants with potential to reduce these damages stand out vitamin C, water soluble antioxidant, and oregano oil, liposoluble antioxidant. The combination of water-soluble and liposoluble antioxidants may promotes synergistic effects in protecting against oxidative damage because they act on different parts of the cells. Thus, we aimed to evaluate the interaction between vitamin C and oregano oil in the antioxidant capacity of *Astyanax aff. bimaculatus* exposed to air. We used factorial scheme 5x2 in a completely randomized design, with five inclusion levels of vitamin C (0.0, 40.0, 80.0, 120.0 and 160.0 mg kg⁻¹) and two inclusion levels of oregano oil in the diet (0.0 and 1000.0 mg kg⁻¹) with three replicates per treatment. We evaluated the blood glucose in fish air exposed air, the activity of superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and malondialdide (MDA) and carbonylated protein (PC) levels in the gills and liver of fish not air exposed and air exposed. In the fish not air exposed, there was no significant interaction between supplementation of vitamin C and oregano oil on the variables of oxidative stress in the gills and liver. In these fish, vitamin C reduced SOD activity and oregano reduced PC levels in the gills. In the liver, vitamin C reduced CAT activity and MDA levels, and oregano reduced MDA levels and increased GST activity. In the fish gills air exposed, there was significant interaction between vitamin C and oregano oil on MDA levels. Vitamin C reduced MDA levels only in presence of oregano oil. In the liver of fish air exposed, there was significant interaction between vitamin C and oregano oil on GST activity. In absence of oregano oil, there was quadratic effect of vitamin C on GST activity, with estimated values that maximize this variable equal to 98.6 mg kg⁻¹ of vitamin C. In presence of oregano, there was cubic effect of vitamin C on GST activity. In the liver of fish air exposed, there was quadratic effect of vitamin C on SOD activity and PC levels, with estimated values that minimize this variable equal to 135,5 and 91,3 mg kg⁻¹ of vitamin C, respectively. Vitamin C also reduced CAT activity and MDA levels in the liver of fish air exposed. Vitamin C reduced blood glucose levels in the fish

air exposed. Therefore, vitamin C and oregano protected fish from oxidative stress before and after exposure to air. The synergistic effect observed after air exposure indicates the importance of supplementation of water soluble and liposoluble antioxidants in diets for farmed fish. The highest concentrations of vitamin C evaluated promoted greater protection against oxidative damage in the gills and liver of *A. aff bimaculatus*. Thus, we recommend the use of 160.0 mg kg⁻¹ of vitamin C. Oregano oil showed a complementary effect to vitamin C in protection against oxidative damage, therefore we recommend the use of 1000.0 mg kg⁻¹ of oregano oil associated with vitamin C supplementation. Under challenge situations, the combination of these two antioxidants is even more important because of the synergistic effect of these antioxidants.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução

Dentre os nutrientes, as vitaminas destacam-se por serem fundamentais para a regulação de reações bioquímicas e por atuarem como cofatores de enzimas (Padayatty & Levine, 2001). Além disso, podem atuar como antioxidantes e na estrutura de fosfolípidos (Burton, 1989; Wang & Quinn, 1999). Nos peixes, estão envolvidas com a regulação da ingestão de alimentos, síntese de proteínas, formação de células sanguíneas, resposta ao estresse, atividade do sistema imune, síntese de hormônios e secreção de muco (Davies et al., 1991; Zuanon et al., 2011; Belo et al., 2012; Falahatkar, et al., 2015). As vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis. Dentre as lipossolúveis estão as vitaminas A, D, E e K. Dentre as hidrossolúveis se encontram as vitaminas do complexo-B e a vitamina C.

2. Vitamina C

Vitamina C é o nome comum dado aos compostos que possuem a atividade biológica do ácido ascórbico (AscH_2) ou AscH^- (ascorbato). Em pH fisiológico, ocorre a predominância do AscH^- . O AscH^- é um excelente agente redutor (antioxidante) por sofrer duas oxidações consecutivas que formam o radical ascorbato (Asc^{\bullet}) e o ácido desidroascórbico (DHA) (Du et al., 2012) (fig.1). Após sofrer oxidação, o Asc^{\bullet} e o DHA são novamente reduzidos a ascorbato por enzimas redutases ou pela glutatona, o que causa diminuição da concentração de DHA no interior da célula e favorece a continuidade de sua absorção a favor de seu gradiente de concentração entre o líquido intersticial e o citoplasma, por difusão facilitada através dos transportadores de glicose (GLUTs 1 e 3). Já o Asc^{\bullet} é transportado para dentro das células por canais sódio-dependentes (Rumsey et al., 1997; Harisson & May, 2009). Todos esses processos são importantes para gerar gradiente de concentração entre o líquido intersticial e o citoplasma, condição necessária para que o AscH^- desempenhe seu papel como antioxidante (Chen et al., 2015) e como cofator de enzimas (May & Ku, 2005).

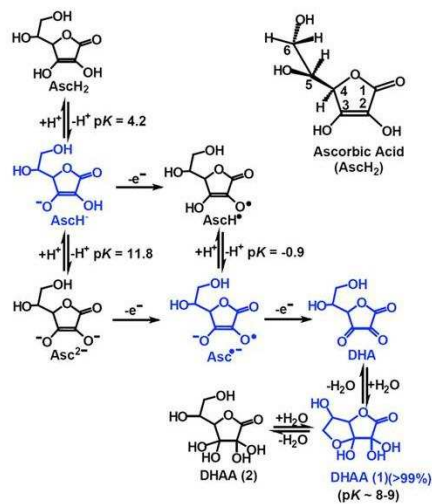


Fig. 1: Diferentes formas do ácido ascórbico. Fonte: (Du et al., 2012).
 AscH₂: ácido ascórbico;
 AscH⁻: ascorbato;
 Asc^{•-}: radical ascorbato;
 DHA: ácido desidroascórbico.

A maioria dos vertebrados é incapaz de sintetizar vitamina C a partir da D-glicose devido a ausência da última enzima dessa rota biossintética, a L-gulonolactona oxidase (Davies et al., 1991; Fracalossi et al., 2001). Dessa forma, a vitamina C é considerada um nutriente essencial e é necessária a suplementação na dieta. Os animais em cultivo são altamente sensíveis à deficiência de vitamina C, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (Rotta, 2003). Nessas condições as diversas regiões do corpo que são formadas por colágeno são prejudicadas, causando deformações no esqueleto (escoliose, lordose e cifose) e nos arcos branquiais, exoftalmia, erosão na nadadeira caudal, desestruturação de vasos sanguíneos (hemorragia), escurecimento e desestruturação da pele (Dabrowski et al, 1990; Davies et al., 1991; Lall & Lewis-McCrea, 2007; Zhou et al., 2012; Chen et al., 2015; Fujimoto et al., 2015; Jiménez-Fernández et al., 2015). A reprodução dos peixes também é afetada, com diminuição da motilidade e concentração do esperma, fecundidade, eclodibilidade dos ovos e sobrevivência dos embriões (Sandnes et al., 1984; Soliman et al., 1986; Lee & Dabrowski, 2004; Shahkar et al., 2015). Além disso, a deficiência de vitamina C pode causar anemia, anorexia e depressão do sistema imune (Ai et al., 2006; Aride et al., 2010; Chen et al., 2015). Todos esses sintomas levam a redução no desempenho produtivo dos peixes (Rotta, 2003). Por outro lado, o excesso de vitamina C pode causar prejuízos para o animal, como má formação do esqueleto (Darias et al., 2011), ou, em algumas condições de pH, presença de íons metálicos, como o ferro e o cobre, pode exibir efeito pró-oxidante (Podmore et al., 1998). Portanto, a vitamina C precisa ser suplementada na dieta em quantidades apropriadas para atender as exigências nutricionais dos peixes. A exigência por vitamina C varia de acordo com a espécie, fase de desenvolvimento, genética e condições fisiológicas, ambientais e nutricionais (Sandnes, 1991; Darias et al., 2011). Dessa forma, conhecer as exigências

nutricionais por vitamina C é fundamental para que não ocorram prejuízos econômicos no sistema produtivo.

A vitamina C atua como cofator para, no mínimo, oito enzimas hidroxilases e oxigenases (May & Qu, 2005), as quais estão envolvidas na síntese, conversão e/ou degradação de várias substâncias com funções fisiológicas. A função da vitamina C é, possivelmente, manter metais cofatores dessas enzimas, como o ferro e cobre, no estado reduzido e no sítio ativo (Davies et al., 1991). A vitamina C participa de diversos aspectos fisiológicos envolvidos no crescimento, como a síntese de colágeno, a oxidação de ácidos graxos, absorção do ferro e conversão do ácido fólico (Davies et al., 1991; Rebouche, 1991; May & Qu, 2005). Participa, também, da síntese e/ou conversão de neurotransmissores, hormônios e parácrinos, importantes nas respostas de estresse e reprodução (Kitabchi, 1967; Shahkar et al., 2015). Além disso, outra importante função da vitamina C é atuar como antioxidante e consequente proteção contra danos em proteína, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Vertuani et al., 2004).

Na síntese de colágeno, a vitamina C participa na hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina, o que permite converter o pró-colágeno em colágeno (Lall and Lewis-McCrea, 2007). O colágeno é uma proteína essencial na formação da pele e esqueleto (ossos e cartilagem), portanto, está diretamente relacionado com o crescimento e desenvolvimento dos peixes, como observado em larvas de *Solea senegalensis* (Jiménez-Fernández et al., 2015), *Pseudoplatystoma coruscans* (Fugimoto et al., 2013), *Perca flavescens* (Lee & Dabrowski, 2004) e *Oreochromis mossambicus* (Soliman et al., 1986). A formação de colágeno, também, é importante no processo de cicatrização de feridas (Sandnes, 1991) e, portanto, sua suplementação é essencial em dietas para peixes cultivados, particularmente em sistemas intensivos, uma vez que os peixes estão frequentemente sujeitos a danos físicos devido ao manejo e utilização de altas densidades de estocagem.

No metabolismo energético, a vitamina C contribui para oxidação de ácidos graxos por meio da hidroxilação de enzimas que convertem a lisina e a metionina em carnitina. A carnitina é essencial para o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias, o que contribui para a produção de ATP (Rebouche, 1991). Dessa forma, a obtenção de energia a partir da oxidação de ácidos graxos pode contribuir para a redução da oxidação de proteínas, poupando-as para serem utilizadas no crescimento, desenvolvimento e reprodução.

Quanto ao ferro, a vitamina C contribui para a redução do ferro para estado ferroso, o que promove a sua absorção pelo intestino (Davies et al., 1991) e seu

transporte no organismo (Rotta, 2003). Portanto, a vitamina C atua na prevenção de anemia nos peixes, como observado em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Aride et al., 2010). A vitamina C também, contribui para a conversão do ácido fólico em ácido folínico, importante para a prevenção da anemia (Davies et al., 1991).

A vitamina C pode participar da síntese e/ou conversão de neurotransmissores, hormônios e parácrinos que estão envolvidos em processos relacionados com o controle fisiológicos das células, tecidos e órgãos, como as respostas de estresse e reprodução. Quanto à reprodução, a vitamina C pode atuar como cofator de enzimas envolvidas na síntese de noradrenalina. A noradrenalina estimula a liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e de gonadotrofinas (LH e FSH) que, por sua vez, estimulam a liberação de hormônios esteroides, os quais são responsáveis pelo crescimento das gônadas e pela ovulação (Dabrowski & Ciereszko, 2001). Alguns estudos relatam os benefícios da suplementação de vitamina C em dieta para peixes reprodutores na qualidade do sémen, maturação gonadal, eclodibilidade, fecundidade, número e tamanho dos ovos (Sandnes et al., 1984; Soliman et al., 1986; Blom & Dabrowski, 1995; Lee & Dabrowski, 2004; Shahkar et al., 2015).

A vitamina C participa como cofactor na biossíntese de ambos os grupos de hormônios envolvidos nas respostas de estresse, as catecolaminas e hormônios corticosteroides (Patak et al., 2004). Portanto, a Vitamina C é essencial para que os animais possam apresentar respostas fisiológicas necessárias para lidar com fatores estressores. Apesar da vitamina C ser essencial para a síntese de noradrenalina (Levine et al., 1985), existem poucos indícios que esta estimule a secreção deste neurohormônio (Kuo et al., 1979). Portanto, ainda está incerto como a vitamina C participa das respostas de estresse ativadas pela via hipotálamo-sistema nervoso simpático. A vitamina C pode tanto estimular (Shimizu, 1970) como inibir (Shimizu, 1970) enzimas envolvidas na síntese de cortisol, sendo que a estimulação ocorreu apenas em porcos da Índia com escorbuto (Bacchus, 1957), mas não em animais saudáveis (Spatz & Hofmann, 1965). Além disso, o efeito estimulatório da vitamina C sobre a secreção de cortisol ocorreu apenas localmente, nas glândulas adrenais de humanos, sem aumento significativo no cortisol periférico (Padayatty et al., 2007). O efeito inibitório da vitamina C sobre as respostas de estresse tem sido mais bem documentado, uma vez que diversos autores relatam que a vitamina C causa redução dos níveis de cortisol e/ou glicose plasmática (De la Fuente et al., 1998; Peters et al., 2001; Ortuño et al., 2003; Belo et al., 2012).

Em condições em que o agente estressor persiste, o nível plasmático de cortisol se mantém alto, o que causa, dentre outros efeitos, a depressão do sistema imune (Barton, 2002). Dessa forma, os peixes estão mais susceptíveis às infecções bacterianas e/ou virais. Como a vitamina C pode inibir a síntese e secreção de cortisol (Kitabchi, 1967; Turley et al., 1976; Pintauro & Bergan, 1982), esses efeitos podem ser atenuados. Portanto, é indicada a suplementação de vitamina C em dietas para peixes submetidos a condições de estresse crônico, comum em sistemas intensivos de criação. A vitamina C, também, pode proteger os leucócitos contra a ação de radicais livres, devido ao seu poder antioxidante. A atividade fagocítica gera elevadas quantidades de radicais livres, os quais ajudam a combater os patógenos, porém são tóxicos para os leucócitos e para as células vizinhas, portanto, a vitamina C ajuda a manter a integridade dos leucócitos, o que mantém a funcionalidade do sistema imune (Wintergerst et al., 2007). Além disso, foi observado em experimentos in vitro, que a vitamina C influencia na produção de citocinas pelos monócitos e linfócitos (Härtel et al., 2004). As citocinas são importantes na regulação da resposta inflamatória, por atrair outras células imunitárias (Silverthorn, 2010). Em condições de estresse, as exigências por vitamina C em peixes são maiores uma vez que apenas em altas doses dessa vitamina ocorre redução das concentrações de glicose, cortisol e/ou na capacidade antioxidante, como para *Sparus aurata* alimentados com 3000 mg kg⁻¹ Ortuño et al., (2003) e para *Oncorhynchus mykiss* alimentados com 1000 mg kg⁻¹ Dabrowsk et al., (2004) de vitamina C.

Portanto, a suplementação de vitamina C em dietas para peixes é fundamental para prevenir os efeitos do estresse sobre a saúde e o desempenho produtivo dos peixes cultivados uma vez que estão submetidos a diversos fatores estressores durante o manejo, como exposição ao ar (Mariano et al., 2009) para biometrias e classificações, confinamento (Thompson et al., 1993), hipóxia e hiperóxia (Caldwell & Hinshaw, 1994), altas densidades de estocagem, anestesia (Ortuño et al., 2003), variações de temperatura (Wedemeyer, 1969; Garcia et al., 2009) e presença de patógenos (Zhou et al., 2012; Ai et al., 2006).

3. Estresse oxidativo e vitamina C

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua neutralização através de sistemas biológicos enzimáticos e não enzimáticos, e ocorre quando há excesso dessa produção e/ou redução das funções antioxidantes (Machlin & Bendich, 1987).

Os radicais livres são quaisquer moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua órbita, o que os torna altamente reativos. Dentre eles se encontram as espécies reativas de oxigênio (ROS), como, os radicais superóxido, peróxil, hidroxil, hipoclorito e alcóxil, as moléculas reativas de oxigênio, o oxigênio singlete e o peróxido de hidrogênio (Machlin & Bendich, 1987) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS), o óxido nítrico, o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Shen & liu, 2006; Valko et al., 2007).

As ROS e RNS podem apresentar tanto efeitos benéficos como deletérios às células (Machlin & Bendich, 1987; Valko et al., 2007). Os efeitos benéficos de ROS e RNS ocorrem em condições de concentrações baixas a moderadas. Eles são necessários para diversos processos fisiológicos, como em processos de sinalização celular, defesas contra agente infecciosos e controle da resposta imune (McCord, 2000; Arrigone & Tullio, 2002; Valko et al., 2007). Em concentrações elevadas, ROS e RNS causam danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que prejudica a funcionalidade das células (Machlin & Bendich, 1987). Para que ROS e RNS possam exercer efeitos benéficos, sem riscos de causar danos às células, suas concentrações devem ser mantidas baixas por meio do controle de sua formação e neutralização.

As espécies reativas de oxigênio são formadas durante o metabolismo do oxigênio, principalmente no processo de formação de ATP nas mitocôndrias (cadeia transportadora de elétrons). Primeiramente, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é formado pela redução do oxigênio molecular (fig.2). Apesar do $\text{O}_2^{\cdot-}$ não apresentar alta toxicidade, ele pode reagir com outras moléculas e formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $\text{O}_2^{\cdot-}$, em excesso, pode resultar na liberação de metais de transição, como o ferro e o cobre (Fe^{2+} e Cu^+), que reagem com o H_2O_2 e forma o radical hidroxil (OH^{\cdot}). O OH^{\cdot} está entre os mais tóxicos dos radicais livres por provocar danos na molécula de DNA. Além disso, o OH^{\cdot} é capaz de reagir com os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídeos nas membranas celulares, o que gera o radical lipídico (L^{\cdot}), que é um radical livre altamente reativo. O L^{\cdot} reage com o O_2 e forma o radical peróxil (LOO^{\cdot}). O LOO^{\cdot} quando não eliminado pelas defesas antioxidantes reage com outros lipídios das membranas celulares e forma novamente o L^{\cdot} , que causa peroxidação lipídica por meio de um ciclo de reações, conhecido como propagação de reações em cadeia (fig.2) (Fridovich, 1999; Valko et al., 2007).

A espécie reativa de nitrogênio (NO^{\cdot}) é formada durante a síntese do óxido nítrico. Quando produzida em excesso pode reagir com o radical superóxido e formar o

ânion peroxinitrito (ONOO^-), um forte agente oxidante que causa danos em DNA e lipídeos (fig. 2) (Valko et al., 2007).

A neutralização das ROS e RNS se dá por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (fig. 2). Quanto às defesas não enzimáticas, compostos que podem doar elétrons e neutralizar os radicais livres são considerados antioxidantes. Dentre elas destacam-se a glutatona (GSH), o ácido lipoico, as vitaminas C e E, os carotenoides e os flavonoides (Arrigone & Tullio, 2002; Valko et al., 2007). A superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (G-px), glutatona redutase (GRED) e glutatona-S-transferase (GST) são algumas enzimas que participam da neutralização das ROS e RNS. A SOD atua na conversão do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que é convertido em água e oxigênio molecular pela CAT nos peroxissomos, ou pela G-px no citoplasma, mitocôndrias e núcleo. A G-px, também, pode converter lipídeos hidroperóxidos em álcool (LOH). A GST cataliza reações da glutatona com produtos da peroxidação lipídica. A GRED participa indiretamente no combate aos radicais livres, por regenerar a GSH que é uma das principais moléculas antioxidantes dos compartimentos celulares. A GSH atua diretamente na redução dos radicais livres ou indiretamente na regeneração dos diversos agentes antioxidantes, dentre eles, a G-px, a GST e as vitaminas E e C. Participa, também, da conversão do radical NO^\cdot em S-nitrosoglutatona (GSNO) (fig. 2)(Hermes-Lima, 2004; Valko et al., 2007; Ferreira et al., 2009).

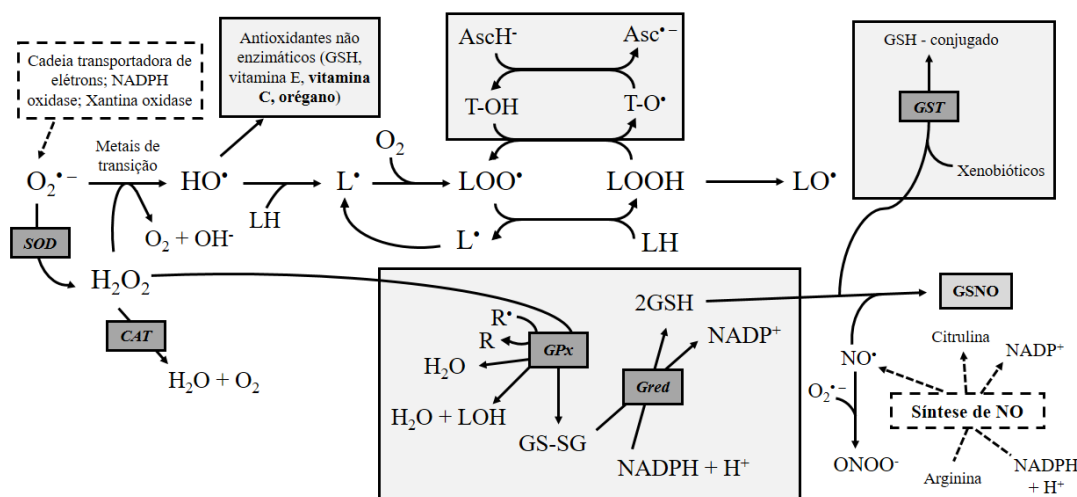


Fig. 2: Principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e as principais defesas enzimáticas e não enzimáticas das células. As principais fontes endógenas de ROS e RNS estão representadas nos retângulos pontilhados. As principais defesas antioxidantes estão representadas nos retângulos em cinza e as principais

defesas enzimáticas estão representadas em itálico. Fonte: (Ferreira et al., 2009, modificado).

Dentre as defesas não enzimáticas, a vitamina C se destaca por apresentar características importantes na eliminação de radicais livres. Em pH fisiológico, a vitamina C ocorre predominantemente na forma de ascorbato (AscH^-). Por sofrer duas oxidações consecutivas, o AscH^- é um excelente agente antioxidante por reagir com diferentes radicais livres, se regenerar e estar presente em quantidades adequadas nas células (Arrigone & Tullio, 2002). O AscH^- pode tanto neutralizar diretamente os radicais livres, nos compartimentos aquosos das células (Frei et al., 1989) quanto, atuar indiretamente pela regeneração da vitamina E e/ou pelo aumento da capacidade antioxidante (Burton & Ingold, 1986; Chen et al., 2015) (fig.2). A vitamina E é o principal agente protetor contra a peroxidação lipídica nas membranas biológicas. A peroxidação lipídica causa desestruturação das membranas celulares, que leva a excessiva perda do material intracelular e a inviabilidade das células. Portanto, a ação combinada do AscH^- e a vitamina E ajuda a eliminar os radicais livres de uma das regiões mais importantes e sensíveis das células, as membranas biológicas (Burton & Ingold, 1986; Sies, 1997). De fato, a combinação entre diferentes substâncias antioxidantes representa excelente estratégia de proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que tem sido observado efeito sinérgico entre esses, provavelmente pela regeneração do α tocoferol oxidado pela vitamina C (Burton & Ingold, 1986), compostos fenólicos (Hirano et al., 2001), carotenoides (Terao et al., 1980), aminoácidos (Sims & Fioriti, 1976) e selênio (Le et al., 2014).

A combinação entre os antioxidantes vitamina C e flavonoides (compostos fenólicos) pode aumentar o tempo de proteção contra danos oxidativos, como observado em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Mathiese et al., 1996) e em fibroblastos humanos (Skaper et al., 1997). Esse efeito pode ser devido à capacidade de regeneração dos flavonoides pela vitamina C, assim como ocorre com a vitamina E (Burton & Ingold, 1986). Portanto, é provável que os óleos essenciais, ricos em flavonoides apresentem efeitos sinérgicos com a vitamina C contra os danos oxidativos em peixes.

4. Óleo de orégano em dietas para peixes

Dentre os óleos essenciais com potencial para agir sinergicamente com a Vitamina C destaca-se o óleo de orégano, em função de sua alta atividade antioxidante (Dorman et al., 2000; Yan et al., 2016). Sua ação antioxidante se deve à presença de compostos fenólicos, que são capazes de neutralizar radicais livres, bloquear a

peroxidação lipídica pela neutralização de radicais lipídicos, aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e recuperar a forma reduzida da vitamina E (fig. 2) (Ferrali et al., 1997; Cervato et al., 2000; Hirano et al., 2001; Bonzin et al., 2006; Gümüs et al., 2017). O óleo de orégano é derivado da planta *Origanum vulgare*, família Lamiaceae, nativa do Mediterrâneo, porém cultivado e utilizado mundialmente como planta medicinal e condimento (Letswaart, 1980). Além de sua função antioxidante, o óleo de orégano apresenta atividade bactericida, fungicida, antiparasítica, anticarcinogênica, anti-inflamatória (Sivropoulou et al., 1996; Bonzin et al., 2006; Rusenova & Parvanov, 2009; Zheng et al., 2009; Cleff et al., 2010; Govaris et al., 2010; Ocaña-Fuentes et al., 2010; Santoro et al., 2007; Gormez & Diler, 2014; Pesavento et al., 2015) e digestiva (Ferreira et al., 2016; Franciosini et al., 2016). Essas propriedades são atribuídas aos compostos fenólicos carvacrol e timol e os monoterpenos γ -terpineno e p-cimeno, principais componentes do óleo de orégano (Bampidis et al., 2005; Bonzin et al., 2006; Zheng et al., 2009).

Os óleos essenciais do gênero *Origanum*, e os seus principais componentes, tem apresentado resultados promissores quando adicionados em dietas para peixes cultivados, com melhorias no desempenho produtivo, composição da carcaça, aumento na retenção da proteína muscular (Zheng et al., 2009; Ahmadifar et al., 2011; Ferreira et al., 2014), modulação na morfologia intestinal e na secreção de muco (Ferreira et al., 2016), modulação na atividade da enzima lisozima (Volpatti et al., 2012; Diler et al., 2017), aumento do número de linfócitos (Ahmadifar et al., 2011), aumento da capacidade antioxidante e inibição da população de organismos anaeróbios no intestino (Giannenas et al., 2012; Franciosini et al., 2016) e produção, crescimento e maturação de ovócitos (Ziari et al., 2015). Alguns estudos mostram o efeito desses componentes na secreção de enzimas digestivas de aves (Jang et al., 2006; Hashemipour et al., 2013). Entretanto, alguns estudos não mostram efeitos significativos nas variáveis de desempenho produtivo (Giannenas et al., 2012; Peterson et al., 2015; Cararo et al., 2017), na capacidade antioxidante e/ou a saúde dos peixes, ou mostram efeitos negativos quando suplementados em altas doses, como, leves necroses ou degeneração nos rins e no fígado, diminuição do peso das vísceras e do fígado, com consequente diminuição dos índices viscerossomático e esplenossomático (Pérez-Sánchez et al., 2015; Yigit et al., 2017).

A ausência de efeitos do orégano pode estar relacionada com as condições experimentais. Em geral, os melhores resultados obtidos com o orégano, ou os seus principais componentes em dietas para peixes tem sido observados quando estes estão

submetidos a alguma condição de cultivo adversa ou subótima, como ocorre em infecções por patógenos (Zheng et al., 2009; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Volpatti et al., 2012; Peterson et al., 2015; Diler et al., 2016). Devido ao seu poder antioxidante comprovado em peixes (Giannenas et al., 2012), é possível que o orégano atue também em situações de cultivo que podem causar estresse oxidativo, como alterações nos níveis de oxigênio da água e exposição ao ar para biometrias e classificações (Ortuño et al., 2003; Pereira-da-Silva et al., 2016).

A exposição ao ar causa estresse oxidativo tanto pela falta de suprimento de oxigênio nas brânquias, quanto pela reoxigenação quando os peixes retornam para a água e a ventilação branquial é restabelecida (Welker et al., 2013). Nessas condições, a resposta mais comum é o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, que pode ocorrer com o aumento da síntese e/ou diminuição de sua degradação. Essa é uma estratégia fisiológica que prepara o animal contra o estresse oxidativo durante a reoxigenação, processo conhecido como preparação para o estresse oxidativo (Welker et al., 2013) (fig. 3). Porém, em períodos prolongados de exposição ao ar pode ocorrer diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (Lushchak et. al, 2001) e prejuízos para a saúde dos animais. A exposição ao ar, também, desencadeia respostas de estresse nos peixes como aumento nos níveis de cortisol, glicose e lactato plasmáticos (Lim & Hur, 2018). O cortisol causa proteólise e inibição da síntese de proteínas nos músculos, ossos, tecido conjuntivo e pele (Storey, 1996; Freeman & Idler, 1973), com prejuízo no crescimento e, conseqüentemente, no rendimento de carcaça (Storey, 1996; Davis et al., 1985). Além disso, o estresse oxidativo causa oxidação de lipídeos e proteínas que comprometem a qualidade da carne (Giannenas et al., 2012). Portanto, o uso de orégano em dietas para peixes pode contribuir para a redução dos efeitos adversos das repostas de estresse e estresse oxidativo e, conseqüentemente minimizar os prejuízos no crescimento, na eficiência de utilização dos nutrientes e na saúde dos peixes cultivados. Em função do efeito antioxidante do orégano, sua utilização em dietas para peixes também pode contribuir para a redução da utilização de outros agentes antioxidantes como a vitamina C. Desse modo, a vitamina C poderia ser poupada para outros processos fisiológicos como a síntese de colágeno, essencial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução de peixes (May & Qu, 2005).

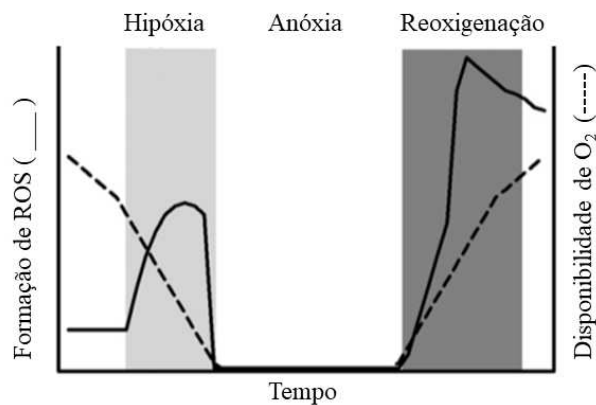


Fig. 3: Padrão proposto de formação de ROS durante o aumento da exposição à hipóxia (levando à anoxia) em animais que apresentam ativação de defesa antioxidante induzida por hipóxia (Welker et al., 2013).

O lambari-do-rabo-amarelo, ordem Characiformes, família Characidae, pertence ao grupo *Astyanax aff. bimaculatus*, mais abundante da América do Sul. Esse grupo apresenta 22 espécies que ainda carecem de análises filogenéticas, portanto, todos os peixes desse grupo são assim denominados até classificação precisa (Kavalko et al., 2001; Lucena & Soares, 2016). O lambari-do-rabo-amarelo apresenta grande importância na cadeia alimentar por participar do controle biológico de insetos aquáticos e servir de alimento para peixes carnívoros (Garutti, 2003). No contexto de produção de peixes, é considerada uma espécie com bom potencial por apresentar hábito alimentar onívoro, com tendência a insetívoro (Peretti & Andrian, 2008), com boa aceitação de dietas secas e possibilidade de utilização de ingredientes menos onerosos, como as fontes de proteína vegetal (Sussel et al., 2014). O rápido crescimento e ciclo de vida curto permitem que possam ser realizados vários ciclos de produção durante o ano e, portanto, apresente boa rentabilidade econômica. O lambari é consumido principalmente como petisco e em algumas regiões do Brasil, o seu óleo é extraído para o consumo humano (Garutti, 2003). Boa parte do comércio de lambaris atende o mercado de iscas vivas para pesca esportiva e, também, apresenta potencial para ser comercializado enlatado (Dutra et al., 2012).

Apesar de apresentar potencial para a piscicultura, ainda são escassos os estudos sobre exigências nutricionais e aditivos em dietas para o lambari-do-rabo-amarelo. Portanto, este estudo pode contribuir para aprimorar um pacote tecnológico para a criação dessa espécie.

5. Referências bibliográficas

- 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(4), 1057-1060.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H., & Liufu, Z. (2006). Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 261(1), 327-336.
- Arde, P. H. R., Ferreira, M. S., Duarte, R. M., De Oliveira, A. M., De Freitas, D. V., Dos Santos, A. L. W., & Val, A. L. (2010). Ascorbic acid (Vitamin C) and iron concentration in tambaqui, *Colossoma macropomum*, iron absorption. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(s2), 291-297.
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1-3), 1-9.
- Bacchus, H. (1957). In vitro conversion of desoxycortisol to cortisol by adrenal tissues in ascorbic acid deficiency. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 188(2), 297-302.
- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Spais, A. B., & Chatzopoulou, P. S. (2005). Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 121(3-4), 285-295.
- Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids¹. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517-525.
- Belo, M. A. D. A., Moraes, J. R. E. D., Soares, V. E., Martins, M. L., Brum, C. D., & Moraes, F. R. D. (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(7), 1015-1021.
- Blom, J. H., & Dabrowski, K. (1995). Dietary ascorbyl phosphate results in high ascorbic acid content in eggs of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(1), 75-79.

- 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.
- Burton, G. W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, *119*(1), 109-111.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1986). Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, *19*(7), 194-201.
- Caldwell, C. A., & Hinshaw, J. (1994). Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture*, *126*(1-2), 183-193.
- Cararo, L. M., Sado, R. Y., Muelbert, B., & de Borba, M. R. (2017). Evaluation of oregano essential oil as a growth promoter and resistance stimulator against *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa, Ciliophora) in silver catfish juveniles, *Rhamdia* sp. (Siluriformes, Heptapteridae). *Semina: Ciências Agrárias*, *38*(6), 3871-3886.
- Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B. (2000). Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) Leaf extracts. *Journal of Food Biochemistry*, *24*(6), 453-465.
- Chen, Y. J., Yuan, R. M., Liu, Y. J., Yang, H. J., Liang, G. Y., & Tian, L. X. (2015). Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, *435*, 431-436.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Xavier, M., Schuch, L. F., Meireles, M. C. A., Rodrigues, M. R. A., & Mello, J. R. B. D. (2010). In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(1), 116-123.
- Dabrowski, K., & Ciereszko, A. (2001). Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research*, *32*(8), 623-638.
- Dabrowski, K., El-Fiky, N., Köck, G., Frigg, M., & Wieser, W. (1990). Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, *91*(3-4), 317-337.

- Dabrowski, K., Leea, K., Guzb, L., Verlhacc, V., Gabaudan, J. (2004). Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233, 383 – 392.
- Darias, M. J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2011). Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 315(1-2), 49-60.
- Davies, M. B., Austin, J., & Partridge, D. A. (1991). Vitamin C: its chemistry and biochemistry. *Royal Society of Chemistry*.
- Davis, K. B., Torrance, P., Parker, N. C., & Suttle, M. A. (1985). Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Biology*, 27(2), 177-184.
- De la Fuente, M., Ferrandez, M. D., Burgos, M. S., Soler, A., Prieto, A., & Miquel, J. (1998). Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(4), 373-380.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. (2016). Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 844-851.
- Dorman, H. D., Surai, P., & Deans, S. G. (2000). In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 241-248.
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(2), 443-457.
- Dutra, F. M., Machado, W. J., Caetano, M. S., & Gobbo, D. A. (2012). Avaliação sensorial do processamento em conserva, utilizando-se as espécies: tilápia (*Oreochromis niloticus*), lambari (*Astianax spp*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v14, (3), 239-244.
- Falahatkar, B., Soltani, M., Abtahi, B., Kalbassi, M. R., & Pourkazemi, M. (2015). The role of dietary L-ascorbyl-2-polyphosphate on the growth and physiological

- functions of beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 46(12), 3056-3069.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., & Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416(2), 123-129.
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543-1560.
- Ferreira, P. M. F., Caldas, D. W., Salaro, A. L., Sartori, S. S., Oliveira, J. M., Cardoso, A. J., & Zuanon, J. A. (2016). Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 911-922.
- Ferreira, P. M. F., Nascimento, L. S., Dias, D. C. Moreira, D. M. V, Salaro, A. L., Freitas, M. B. D., Carneiro, A. P. S., & Zuanon, J. A. S. (2014). Essential oregano oil as a growth promoter for the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 28-34.
- Fracalossi, D. M., Allen, M. E., Yuyama, L. K., & Oftedal, O. T. (2001). Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192(2-4), 321-332.
- Franciosini, M. P., Casagrande-Proietti, P., Forte, C., Beghelli, D., Acuti, G., Zanichelli, D., & Trabalza-Marinucci, M. (2016). Effects of oregano (*Origanum vulgare L.*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) aqueous extracts on broiler performance, immune function and intestinal microbial population. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 474-479.
- Freeman, H. C., & Idler, D. R. (1973). Effects of corticosteroids on liver transaminases in two salmonids, the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *General and Comparative Endocrinology*, 20(1), 69-75.
- Frei, B., England, L., & Ames, B. N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6377-6381.
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 13-18.

- Fujimoto, R. Y., Santos, R. F., & Carneiro, D. J. (2013). Morphological deformities in the osseous structure in spotted sorubim *Pseudoplatystoma coruscans* (agassiz & spix, 1829) with vitamin c deficiency. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(1), 379-384.
- Garcia, F., Moraes, F. R. D., & Martins, M. L. (2009). Challenge of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets supplemented with vitamins C and E by *Aeromonas hydrophila* under different temperature. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(2), 378-385.
- Garutti, V. (2003). *Piscicultura ecológica*. UNESP.
- Giannenas, I., Triantafyllou, 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, 26-32.
- Gormez, O., & Diler, O. (2014). In vitro antifungal activity of essential oils from *Tymbra*, *Origanum*, *Satureja* species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. *Aquaculture Research*, 45(7), 1196-1201.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., & Chatzopoulou, P. S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 175-180.
- Gümüs, R., Erol, H. S., Imik, H., & Halice, M. (2017). The Effects of the Supplementation of Lamb Rations with Oregano Essential Oil on the Performance, Some Blood Parameters and Antioxidant Metabolism in Meat and Liver Tissues. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3), 395-401.
- Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 719-730.
- Härtel, C., Strunk, T., Bucsky, P., & Schultz, C. (2004). Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine*, 27(4-5), 101-106.
- Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A., & Veldkamp, T. (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme

- activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry science*, 92(8), 2059-2069.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and Adaptation*, 319-368.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., & Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(5), 357-362.
- Jang, I. S., Ko, Y. H., Kang, S. Y., & Lee, C. Y. (2006). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 134(3-4), 304-315.
- Jiménez-Fernández, E., Ponce, M., Rodríguez-Rúa, A., Zuasti, E., Manchado, M., & Fernández-Díaz, C. (2015). Effect of dietary vitamin C level during early larval stages in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 443, 65-76.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandao, K. D. O., Garcia, C., & Almeida-Toledo, L. F. (2011). Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax aff. bimaculatus*(Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(2), 108-119.
- Kitabchi, A. E. (1967). Ascorbic acid in steroidogenesis. *Nature*, 215(5108), 1385.
- Kuo, C. H., Hata, F., Yoshida, H., Yamatodani, A., & Wada, H. (1979). Effect of ascorbic acid on release of acetylcholine from synaptic vesicles prepared from different species of animals and release of noradrenaline from synaptic vesicles of rat brain. *Life sciences*, 24(10), 911-915.
- Lall, S. P., & Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - an overview. *Aquaculture*, 267(1-4), 3-19.
- Le, K. T., Fotadar, R., & Partridge, G. (2014). Selenium and vitamin E interaction in the nutrition of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*): physiological and immune responses. *Aquaculture Nutrition*, 20(3), 303-313.
- Lee, K. J., & Dabrowski, K. (2004). Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230(1-4), 377-389.

- Letswaart, J. H.. (1980). *A taxonomic revision of the genus Origanum (Labiatae)* (Vol. 4, p. 158). The Hague: Leiden University Press.
- Levine, M., Morita, K., Heldman, E., & Pollard, H. B. (1985). Ascorbic acid regulation of norepinephrine biosynthesis in isolated chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 15598-15603.
- Lim, H. K., & Hur, J. W. (2018). Effects of Acute and Chronic Air Exposure on Growth and Stress Response of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 143-151.
- Lucena, C. D., & Soares, H. G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072(1), 101-125.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., & Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), R100-R107.
- Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Mariano, W. D. S., Oba, E. T., Santos, L. R. B. D., & Fernandes, M. N. (2009). Respostas fisiológicas de jeju ("Hoplerythrinus unitaeniatus") expostos ao ar atmosférico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10(1).
- Mathiesen, L., Wang, S., Halvorsen, B., Malterud, K. E., & Sund, R. B. (1996). Inhibition of lipid peroxidation in low-density lipoprotein by the flavonoid myrigalone B and ascorbic acid. *Biochemical pharmacology*, 51(12), 1719-1725.
- May, J. M., & Qu, Z. C. (2005). Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1), 178-186.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652-659.
- Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutierrez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-

- inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1568-1575.
- Ortuno, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish Immunology*, 14(2), 145-156.
- Padayatty, S. J., & Levine, M. (2001). New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *Canadian Medical Association Journal*, 164(3), 353-355.
- Padayatty, S. J., Doppman, J. L., Chang, R., Wang, Y., Gill, J., Papanicolaou, D. A., & Levine, M. (2007). Human adrenal glands secrete vitamin C in response to adrenocorticotrophic hormone. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(1), 145-149.
- Patak, P., Willenberg, H. S., & Bornstein, S. R. (2004). Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medula. *Endocr. Res.*, 30, 871-875.
- Pereira-da-Silva, E. M., & Oliveira, R. H. F. (2016). Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000) to air exposure. *Aquaculture Research*, 48(6), 3268-3271.
- Peretti, D., & Andrian, I. D. F. (2008). Feeding and morphological analysis of the digestive tract of four species of fish (*Astyanax altiparanae*, *Parauchenipterus galeatus*, *Serrasalmus marginatus* and *Hoplias aff. malabaricus*) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(3), 671-679.
- Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Calduch-Giner, J. A., Browdy, C. L., & Sitjà-Bobadilla, A. (2015). Effects of dietary NEXT ENHANCE® 150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 117-128.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., & Nostro, A. L. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188-199.

- Peters, E. M., Anderson, R., Nieman, D. C., Fickl, H., & Jogessar, V. (2001). Vitamin C supplementation attenuates the increases in circulating cortisol, adrenaline and anti-inflammatory polypeptides following ultramarathon running. *International Journal of Sports Medicine*, 22(7), 537-543.
- Peterson, B. C., Peatman, E., Ourth, D. D., & Waldbieser, G. C. (2015). Effects of a phytogetic feed additive on growth performance, susceptibility of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* and levels of mannose binding lectin. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 21-25.
- Pintauro, S. J., & Bergan, J. G. (1982). Effects of ascorbic acid on in vitro steroidogenesis in guinea pigs. *The Journal of Nutrition*, 112(3), 584-591.
- Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P., & Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392(6676), 559.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African Journal of Microbiology Research*, 4(5), 420-425.
- Rebouche, C. J. (1991). Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), 1147S-1152S.
- Rotta, M. A. (2003). Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. *Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., & Levine, M. (1997). Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18982-18989.
- Rusenova, N., & Parvanov, P. (2009). Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, 7(1).
- Sandnes, K. (1991). Vitamin C in fish nutrition-a review. *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernering*, IV, 3-32.
- Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O. R., & Utne, F. (1984). The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43(1-3), 167-177.
- Santoro, G. F., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L. G. L., Salgado, A. P. S., Menna-Barreto, R. F., & Soares, M. J. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and

- thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100(4), 783-790.
- Shahkar, E., Yun, H., Kim, D. J., Kim, S. K., Lee, B. I., & Bai, S. C. (2015). Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 438, 115-121.
- Shen, H. M., & Liu, Z. G. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 928-939.
- Shimizu, K. (1970). Effects of ascorbic acid on the side-chain cleavage of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 210(2), 333-340.
- Sies, H. (1997). Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Exp. Physiol*, 82, 291-295.
- Silverthorn, D. U. (2010). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. Artmed editora.
- Sims, R. J., & Fioriti, J. A. (1976). Methional as an antioxidant for vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54(1), 4-7.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202-1205.
- Skaper, S. D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M., & Leon, A. (1997). Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(4), 669-678.
- Soliman, A. K., Jauncey, K., & Roberts, R. J. (1986). The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, 59(3-4), 197-208.
- Spatz, L., & Hofmann, F. G. (1965). Guinea pig adrenal steroid lip-hydroxylation: cofactor requirements, *Fed. Proc.*, 24, 449.

- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Sussel, F. R., Viegas, E. M. M., Evangelista, M. M., Gonçalves, G. S., Salles, F. A., & Gonçalves, L. U. (2014). Replacement of animal protein with vegetable protein in the diets of *Astyanax altiparanae*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36(4), 343-348.
- Terao, J., Yamauchi, R., Murakami, H., & Matsushita, S. (1980). Inhibitory effects of tocopherols and β -carotene on singlet oxygen-initiated photooxidation of methyl linoleate and soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 4(1-2), 79-93.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F., & Secombes, C. J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114(1-2), 1-18.
- Turley, S. D., West, C. E., & Horton, B. J. (1976). The role of ascorbic acid in the regulation of cholesterol metabolism and in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 24 (1), 1-18.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1677-1694.
- Volpatti, D., Bulfon, C., Tulli, F., & Galeotti, M. (2012). Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31-44.
- Wang, X., & Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38(4), 309-336.
- Wedemeyer, G. (1969). Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29(3), 1247-1251.

- Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, É. G., & Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4), 384-404.
- Wintergerst, E. S., Maggini, S., & Hornig, D. H. (2007). Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(4), 301-323.
- Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., & Honermeier, B. (2016). Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare L.*) collection of the German National Genebank. *Industrial Crops and Products*, 92, 19-25.
- Yigit, N. O., Diler, O., Koca, S. B., & Gormez, O. (2017). Effect on Histology and Nutrient Digestibility of Supplemented *Origanum onites* Essential Oil to Rainbow Trout Diets (*Oncorhynchus mykiss*). *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S262-S267.
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y., 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(3-4), 214-218.
- Zhou, Q., Wang, L., Wang, H., Xie, F., & Wang, T. (2012). Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish & shellfish Immunology*, 32(6), 969-975.
- Ziari, S. B., Naji, T., & Sahafi, H. H. (2015). Comparison of the effects of *Origanum vulgare* with LHRH-A2 and 17 β -estradiol on the ultrastructure of gonadotroph cells and ovarian oogenesis in immature *Trichogaster trichopterus*. *Animal Reproduction Science*, 161, 32-39.
- Zuanon, J. A. S., Salaro, A. L., Furuya, W. M. (2001). Produção e nutrição de peixes ornamentais. *R. Bras. Zootec.*, 40, 165-174

CAPÍTULO 2

Ação antioxidante da vitamina C e do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em
Astyanax aff. bimaculatus expostos ao ar

Artigo redigido com base nas normas da revista *Journal of Animal Physiology and
Animal Nutrition*.

Ação antioxidante da vitamina C e do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em
Astyanax aff. bimaculatus expostos ao ar.

RESUMO

Objetivamos avaliar a interação entre vitamina C e óleo de orégano na capacidade antioxidante de *Astyanax aff. bimaculatus* submetidos à exposição ao ar. Utilizamos esquema fatorial 5x2 em delineamento inteiramente casualizado, com cinco níveis de vitamina C (0,0; 40,0; 80,0; 120,0 e 160,0 mg kg⁻¹) e dois níveis de óleo de orégano na dieta (0,0 e 1000,0 mg kg⁻¹) com três repetições. Após 45 dias de alimentação com as dietas teste, os peixes foram expostos ao ar por cinco min. Amostras de brânquias e fígado foram coletadas antes e após a exposição ao ar para as análises de estresse oxidativo. Antes da exposição ao ar, a vitamina C reduziu os danos oxidativos e a atividade das enzimas SOD nas brânquias e CAT no fígado. O óleo de orégano reduziu os danos oxidativos e aumentou a atividade da GST no fígado. Nas brânquias dos peixes expostos ao ar, a vitamina C reduziu o MDA apenas na presença do orégano. Nesse tecido, a vitamina C apresentou diferentes efeitos na modulação da atividade da GST em função da ausência ou presença do orégano, o que indica efeito sinérgico entre esses antioxidantes. A vitamina C também reduziu os níveis de MDA, PC e a atividade da CAT e SOD no fígado dos peixes expostos ao ar. Portanto, a vitamina C e o orégano protegem os peixes contra o estresse oxidativo antes e após a exposição ao ar. Entretanto, a ação conjunta de um antioxidante hidrossolúvel (vitamina C) e um lipossolúvel (óleo de orégano) foi mais eficiente na proteção contra o estresse oxidativo, do que o efeito de cada antioxidante isoladamente. Em função da exposição ar decorrente dos manejos de biometria e classificação na criação de peixes, recomendamos a suplementação simultânea de 160 mg kg⁻¹ de vitamina C e 1000 mg kg⁻¹ de óleo de orégano na dieta.

Palavras-chave: extratos vegetais, óleos essenciais, peixes

1. Introdução

Durante os manejos de rotina na piscicultura, os peixes são frequentemente expostos ao ar para a realização de biometrias e classificações (Pereira-da-Silva & Oliveira, 2016), o que desencadeia respostas de estresse, como aumento nos níveis de cortisol, glicose e lactato plasmáticos (Lim & Hur, 2018). A exposição ao ar, também, causa estresse oxidativo tanto pela falta de suprimento de oxigênio nas brânquias, quanto pela reoxigenação, quando os peixes retornam para a água e a ventilação branquial é restabelecida (Lushchak, Lushchak, Mota & Hermes-lima, 2001). O estresse oxidativo é prejudicial à saúde dos peixes por causar danos em lipídeos, proteínas (Paital, 2013) e ácidos nucleicos (Ames, Shigenaga & Hagen, 1993; Paital, 2013), que pode levar à redução do consumo de ração, redução do crescimento e aumento da susceptibilidade a doenças (Wilhelm Filho, Torres, Zaniboni-Filho & Pedrosa, 2005; Gao et al., 2013).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) supera a sua neutralização através das defesas enzimáticas e não enzimáticas (Machlin & Bendich, 1987). As enzimas que participam das defesas contra os danos oxidativos são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (G-px), glutathione reductase (GRED) e glutathione-S-transferase (GST). Dentre as defesas não enzimáticas, a vitamina C é o principal antioxidante nos compartimentos aquosos das células (Frei, England & Ames, 1989).

A vitamina C aumenta a capacidade antioxidante das células pela neutralização dos radicais livres (Frei et al., 1989), pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes nos compartimentos aquosos das células (Chen et al., 2015) e pela regeneração de antioxidantes lipossolúveis, como a vitamina E (Burton & Ingold, 1986).

A combinação de antioxidantes hidrossolúveis, como a vitamina C, e lipossolúveis, com a vitamina E, tem mostrado efeitos complementares entre essas substâncias, por atuarem em diferentes partes das células (Hamre, Waagbø, Berge & Lie, 1997), o que pode promover efeitos sinérgicos na capacidade antioxidante (Hamre et al., 1997). Portanto, é provável que outros antioxidantes lipossolúveis apresentem efeito sinérgico com a vitamina C. Dentre os antioxidantes lipossolúveis destacam-se os flavonoides, presentes em diversos óleos essenciais (Bonzin, Mimica-Dukic, Simin & Anackov, 2006) os quais podem neutralizar radicais livres, aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e/ou recuperar a forma reduzida da vitamina E (Cervato et al.,

2000; Hirano et al., 2001; Gümüs, Erol, Imik & Halice, 2017). O orégano, por ser rico nesses compostos (Yan et al., 2016) apresenta alta capacidade antioxidante (Dorman, Surai & Deans, 2000; Yan et al., 2016) e, portanto, pode ser utilizado em combinação com a vitamina C na proteção contra o estresse oxidativo. O orégano ainda apresenta as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, digestiva e redutora de estresse (Bonzin et al., 2006; Ocaña-Fuentes et al., 2010; Zhang et al., 2015; Ferreira et al., 2016). Portanto, o uso de orégano em dietas para peixes pode contribuir para a redução dos efeitos adversos do estresse oxidativo e, conseqüentemente minimizar os prejuízos no crescimento, na eficiência de utilização dos nutrientes e na saúde dos peixes cultivados. Em função do efeito antioxidante do orégano, sua utilização em dietas para peixes pode poupar a vitamina C para outros processos fisiológicos como a síntese de colágeno, essencial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos peixes (May & Qu, 2005). Assim, objetivamos avaliar a interação entre vitamina C e óleo de orégano na capacidade antioxidante de *Astyanax aff. bimaculatus* submetidos à exposição ao ar.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa CEUAP/UFV, protocolo nº 46/2014 (Anexo 1), de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a legislação vigente.

2.1. Animais, dietas e condições experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP), do Departamento de Biologia Animal da UFV, em esquema fatorial 5x2 em delineamento inteiramente casualizado, com cinco níveis de inclusão de vitamina C (0,0; 40,0; 80,0; 120,0 e 160,0 mg kg⁻¹) e dois níveis de inclusão de óleo de orégano, *Origanum vulgare* (0,0 e 1000,0 mg kg⁻¹) na dieta, com três repetições por tratamento. A ração basal foi formulada para conter 36% PB e 3000 kcal EB kg⁻¹ ração (Tabela 1). Foi utilizado um suplemento vitamínico e mineral isento de vitamina C (Tabela 1). A vitamina C (Ascorsil Aqua® - Vansil) e o óleo essencial de orégano (LASZLO®, Tabela 2) foram adicionados à ração basal em substituição ao inerte caulim.

Ao preparar as rações, misturamos previamente o óleo de orégano com óleo de soja, a vitamina C com os micro ingredientes e, posteriormente, misturamos aos demais ingredientes. A mistura foi homogeneizada, peletizada, seca em estufa de ventilação

forçada (30°C por 48h), triturada, peneirada até a obtenção de péletes de tamanho adequado à boca dos peixes nas diferentes fases de desenvolvimento, e estocada em freezer a - 20°C. A análise da composição química das dietas experimentais foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFV. Os teores de energia bruta, matéria seca, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo foram analisados segundo Detmann et al. (2012).

Juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* ($0,25 \pm 0,007\text{g}$) foram mantidos em 30 aquários com 60 litros de água, em sistema de recirculação, dotados de aeração, filtros mecânico, biológico e ultra violeta, temperatura controlada por aquecedor e termostato (27°C) e densidade de estocagem de 35 peixes aquário⁻¹ (0,58 peixes L⁻¹ de água). Cada aquário foi considerado uma unidade experimental.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00 e 17:00 horas). Quinzenalmente avaliamos as seguintes variáveis de qualidade da água: oxigênio dissolvido por meio de oxímetro digital, pH por meio pHmetro digital, nitrito e amônia total por meio de kits colorimétricos. A amônia tóxica foi calculada com base na expressão: amônia tóxica = amônia total / $(1 + 10^{((0,0902 - \text{pH}) + (2730 / (273,2 + \text{temperatura}))))$). A temperatura da água foi avaliada diariamente. Essas variáveis mantiveram-se ao longo de todo o período experimental dentro dos limites adequados para o cultivo peixes tropicais de água doce (Popma & Masser, 1999), com valores médios de oxigênio dissolvido de $6,34 \pm 0,50 \text{ mg L}^{-1}$, pH de $7,05 \pm 0,21$; temperatura $27,14 \pm 0,09 \text{ °C}$, nitrito de $0,00 \text{ mg L}^{-1}$ e amônia tóxica de $0,007 \pm 0,004 \text{ mg L}^{-1}$. Semanalmente realizamos a sifonagem dos aquários para a retirada das fezes.

Após 45 dias, os peixes foram individualmente eutanasiados com óleo de cravo (400 mg L⁻¹ de água), para coleta de fígado e brânquias. Os peixes remanescentes foram mantidos nos aquários por mais 10 dias antes da realização do desafio por exposição ao ar. Durante esse período foi mantida a alimentação com as mesmas dietas experimentais. O desafio foi baseado na metodologia de Pereira-da-Silva & Oliveira (2016). Os peixes foram individualmente expostos ao ar por cinco minutos e, posteriormente, transferidos para aquários de recuperação dotados de aeração e temperatura controlada (27 °C), por trinta minutos. Após esse período, os peixes foram eutanasiados com óleo de cravo (400 mg L⁻¹ de água) para a coleta de sangue, fígado e brânquias.

Tabela 1: Formulação e composição química da ração basal

Ingredientes	Ração basal (g kg ⁻¹)
Farelo de soja	675,0
Fubá de milho	98,4
Farelo de trigo	120,0
Caulim	1,5
L-Lisina	0,6
DL-Metionina	7,8
Óleo de soja	50,0
Fosfato bicálcico	39,0
Sal comum	2,5
Suplemento vitamínico e mineral sem vitamina C ¹	5,0
BHT ²	0,2
Composição química da ração basal	
Matéria seca (%)	90,90
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	2.959,43
Proteína bruta (% da MS)	36,04
Extrato etéreo (% da MS)	7,08
Fibra bruta ³	5,12
Matéria mineral (% da MS)	9,09
Cálcio total ³	1,15
Fósforo disponível ⁴	0,71

¹ Níveis de garantia por quilograma do produto: Ac. Fólico, 50 mg; Acid. Pantotênico, 1.000mg; BHT, 20.000mg; Biotina, 15mg; Cobalto, 10mg; Cobre, 1.6000mg; Colina, 20.000mg; Ferro, 10.000mg; Iodo, 60mg; Manganês, 1.900mg; Niacina, 3.000mg; Selênio, 18mg; Vitamina A, 4.000.000UI; Vit. B1, 590mg; Vit. B12, 1.2000mg; Vit. B2, 1.000mg; Vit. B6, 590mg; Vit. D3, 1.200.000UI; Vit. E, 15.000UI; Vit. K3, 625mg; Zinco, 5.000mg.

² Butil hidroxi tolueno (antioxidante)

³Valores calculados de acordo com a composição química dos alimentos apresentada por Rostagno (2011);

⁴ Valores calculados para tilápia-do-Nilo conforme Miranda et al. (2000).

Tabela 2: Composição química do óleo de orégano fornecida pelo fabricante (LASZLO[®])

Constituinte	g 100 g ⁻¹
α -thujeno	0,4
α -pineno	1,6
canfeno	0,7
sabineno	0,8
mirceno	1,4
α -terpineno	1,1
p-cimeno	12,8
γ -terpineno	8,4
1,8 cineol	0,3
hidrato cis sabineno	1,6
timol	4,7
carvacrol	63,0
β -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°C (3min), 3°C /min, até 200°C. Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FID: 250°C. Vol. de injeção: 1 μ L (concentração 0,5% em clorofórmio).

2.2. Estresse oxidativo

As análises de estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV. As análises foram realizadas nas brânquias e no fígado dos peixes não submetidos e submetidos ao desafio por exposição ao ar. Para isso, formamos um pool de tecidos por repetição até alcançar 200 mg de brânquias e 100 mg de fígado. Os tecidos foram mantidos em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -80°C.

Amostras de fígado e de brânquias foram homogeneizadas em 1,0 e 1,5 mL, respectivamente, de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ e 1mmol L⁻¹ de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), pH 7,4, com homogeneizador de tecidos (OMNI) e . centrifugados a 15000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Com o sobrenadante realizamos as análises da proteína total, das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione S-transferase (GST) e do produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). Os péletes resultantes do homogenato foram utilizados para análise da proteína carbonilada.

A concentração das proteínas totais foi determinada conforme metodologia proposta por Bradford (1976), em leitor de ELISA à 595 nm, com a albumina soro bovina (BSA) como proteína padrão.

A atividade da SOD foi determinada baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do radical superóxido (O₂⁻) e assim diminuir a auto-oxidação do pirogalol (Dieterich, Bieligk, Beulich, Hasenfuss & Prestle, 2000). A mistura da reação continha 99 µL de tampão fosfato (5 mmol L⁻¹, pH 7,0), 6 µL de solução MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium) (PM = 414,3) 1,25mM e 30 µL da amostra. Para iniciar a reação, foi adicionado 15 µL de pirogalol (100 µmol L⁻¹) e mantido incubado à 37 °C por cinco minutos. Após esse período foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (PM= 78,13). A auto-oxidação do pirogalol foi determinada em leitor de ELISA à 570 nm. A atividade da SOD foi expressa como unidade (U) por miligrama de proteína, em que uma U de SOD foi definida como a quantidade que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%.

A atividade da CAT foi realizada pelo método descrito por Aebi (1984), o qual utiliza o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%. O H₂O₂ 30% foi diluído em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0. A mistura da reação continha 990 µL do substrato diluído e 10 µL da amostra. A cada amostra, realizamos a leitura do branco composto por 990 µL de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 7,0 e 10 µL da amostra. O decréscimo do H₂O₂ foi determinada em espectrofotômetro a 240 nm, durante 60s, com intervalos

de 30 s. Uma unidade (U) de CAT foi definida como a quantidade de enzima que decompõe um mmol de H₂O₂ por um minuto. A atividade da CAT foi expresso como U/mg de proteína.

A atividade da GST foi realizada através da formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig, Pabst & Jakoby, 1974). A mistura da reação continha 970 µL de tampão fosfato (5 mmol L⁻¹, pH 7,0), 10 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mmol L⁻¹, 10 µL de glutationa reduzida (GSH) 1 mmol L⁻¹ e 10 µL da amostra. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto a amostra. A atividade da GST foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm, durante 90 s, com intervalo de 30 s. A atividade da GST foi definida pelo conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno e expressa em µmol min⁻¹g⁻¹.

O MDA, principal produto da peroxidação lipídica, foi mensurado de acordo com Buege & Aust (1978). A mistura da reação continha 0,2 mL de amostra e 0,4 mL de solução de ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,375%), ácido clorídrico (0,6%). A mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em banho maria a 90°C por 40 minutos. Após cinco minutos no gelo foi adicionado 0,6 mL de álcool butílico à solução, homogeneizado em vórtex por dois minutos e centrifugado por 10 min, a 9.000 g, a 25 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de MDA, em leitor de ELISA, a 535 nm. A concentração de MDA foi determinada pela curva padrão de concentrações de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos em µmol mg de proteína⁻¹.

O conteúdo de proteína carbonilada foi medido utilizando o reagente 2, 4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), baseado nos grupos carbonil que reagem com DNPH (Levine et al., 1994). Os péletes foram precipitados em solução tricloroacético (TCA) 10% e a solução centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, a 15°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao precipitado 0,5mL de solução DNPH 10 mmol L⁻¹ diluído em ácido clorídrico (7%). A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, a 15°C, o sobrenadante descartado e acrescentado 0,5 mL de TCA 10%. A solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi lavado três vezes com 1 ml de acetato de etila e etanol (1: 1 v / v). A cada lavagem, a solução foi homogeneizada, centrifugada e descartado o sobrenadante. Finalmente, foi adicionado 1 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) 6%, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, à 15°C. Foi realizado um branco para cada amostra, em que foi adicionado 0,5 mL solução de ácido

clorídrico 7% ao precipitado em substituição à solução de DNPH. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração da proteína carbonilada em leitor de ELISA à 370nm. Os resultados foram expressos em nmol mL^{-1} .

2.3. *Análise de glicose sanguínea*

A análise de glicose sanguínea foi realizada por meio de tiras reagentes em aparelho monitor digital Accu-Chek Active® (Roche, Brasil), nos peixes que foram expostos ao ar. Para a coleta do sangue, três peixes de cada unidade experimental (nove peixes/tratamento) foram eutanasiados com óleo de cravo (400 mg L^{-1} de água) e realizado corte com bisturi junto ao pedúnculo da nadadeira caudal. O sangue foi depositado diretamente nas tiras reagentes.

2.4. *Análises estatísticas*

A avaliação do efeito da suplementação de vitamina C, do óleo de orégano e sua interação sobre as variáveis de estresse oxidativo e de glicose sanguínea foi realizada por meio da análise de variância e regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade, pelo *software* R® (pacote *ExpDes.pt*). Para escolha do modelo de regressão foi considerado a significância dos coeficientes da regressão, a magnitude dos coeficientes de determinação e o comportamento da variável em estudo.

3. Resultados

3.1. Estresse oxidativo antes do desafio pela exposição ao ar

Nas brânquias, não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano para nenhuma das variáveis de estresse oxidativo analisadas (Tabela 3). Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da vitamina C apenas para as variáveis superóxido dismutase (SOD) e proteína carbonilada (PC). Para a SOD observamos efeito linear decrescente da vitamina C (Tabela 3, Figura 1). Para a PC houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da vitamina C, pelo teste F (Tabela 3), porém, quando submetida à análise de variância da regressão polinomial, não observamos efeito significativo para os coeficientes de regressão dos modelos linear e quadrático. Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) do óleo de orégano apenas para a variável PC, com redução da concentração dessa variável nos peixes alimentados com óleo de orégano (Tabela 3).

No fígado, não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano para nenhuma das variáveis de estresse oxidativo analisadas (tabela 4). Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da vitamina C em todas as variáveis de estresse oxidativo analisadas, exceto SOD e PC (Tabela 4). Houve efeito linear decrescente da vitamina C para a atividade da enzima catalase (CAT) e para o malondialdeído (MDA) (Tabela 4, figura 2 - A e B). Para a atividade da glutathione S-transferase (GST) houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da vitamina C, pelo teste F (Tabela 4), porém, quando submetida a análise de variância da regressão polinomial, não observamos efeito significativo para os coeficientes de regressão dos modelos linear e quadrático. Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) do óleo de orégano apenas para GST e MDA. Nos peixes alimentados com as dietas suplementadas com óleo de orégano observamos menor concentração de MDA e maior atividade da GST em relação aos não alimentados com orégano (Tabela 4).

Tabela 3 – Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.

	Efeito da interação vitamina C e orégano	Efeito da vitamina C	Vitamina C (mg kg ⁻¹)					Efeito do óleo de orégano	Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)		CV (%)
			0,0	40,0	80,0	120,0	160,0		0,0	1000,0	
MDA (μmol mg prot. ⁻¹)	0,359	0,290	0,14	0,15	0,16	0,12	0,09	0,632	0,14a	0,13a	44,6
PC (nmol mL ⁻¹)	0,803	0,002	3,84	9,51	3,38	8,64	4,40	0,029	7,60a	4,60b	50,29
SOD ¹ (U mg prot. ⁻¹)	0,247	0,022	0,72	0,80	0,70	0,68	0,50	0,548	0,7a	0,66a	21,3
CAT (U mg prot. ⁻¹)	0,393	0,414	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,837	0,01a	0,01a	47,69
GST (μmol min ⁻¹ g ⁻¹)	0,783	0,646	2,91	3,41	2,42	3,69	3,14	0,623	3,25a	2,98a	48,6

MDA-Malondialdeído; PC- Proteína carbonilada; SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GST - Glutathiona S-transferase; CV - Coeficiente de variação experimental;

p>0,05 - Não significativo pelo teste F;

¹Efeito linear: Y = -0,0014x + 0,7962 (R²=0,65);

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p>0,05).

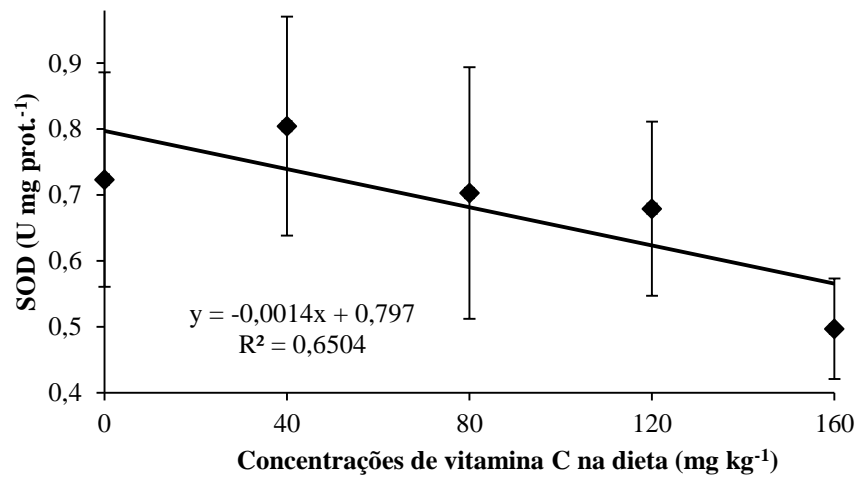


Fig. 1 - Efeito da vitamina C sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (valores médios \pm desvio padrão) nas brânquias de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.

Tabela 4 – Valores médios das variáveis de estresse oxidativo no fígado de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.

	Efeito da interação vitamina C e orégano	Efeito da vitamina C	Vitamina C (mg kg ⁻¹)					Efeito do óleo de orégano	Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)		CV (%)
			0,0	40,0	80,0	120,0	160,0		0,0	1000,0	
MDA ¹ (μmol mg prot. ⁻¹)	0,374	0,002	0,12	0,11	0,14	0,09	0,06	0,020	0,11b	0,09a	29,63
PC (nmol mL ⁻¹)	0,688	0,205	1,91	2,41	2,17	3,77	2,64	0,147	2,14a	2,97a	50,56
SOD (U mg prot. ⁻¹)	0,127	0,119	0,47	0,363	0,42	0,36	0,37	0,207	0,38a	0,42a	20,35
CAT ² (U mg prot. ⁻¹)	0,566	<0,005	3,38	1,97	2,79	1,77	1,75	0,916	2,32a	2,34a	26,88
GST (μmol min ⁻¹ g ⁻¹)	0,537	0,002	10,02	16,40	10,14	15,97	11,88	0,004	11,11a	14,65b	23,16

MDA - Malondialdeído; PC - Proteína carbonilada; SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GST - Glutathiona S-transferase; CV - Coeficiente de variação experimental;

p>0,05 - Não significativo pelo teste F;

¹ Efeito linear: $Y = -0,0003 + 0,01291 (R^2=0,49)$;

² Efeito linear: $Y = -0,0087x + 3,0255 (R^2=0,57)$;

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p>0,05).

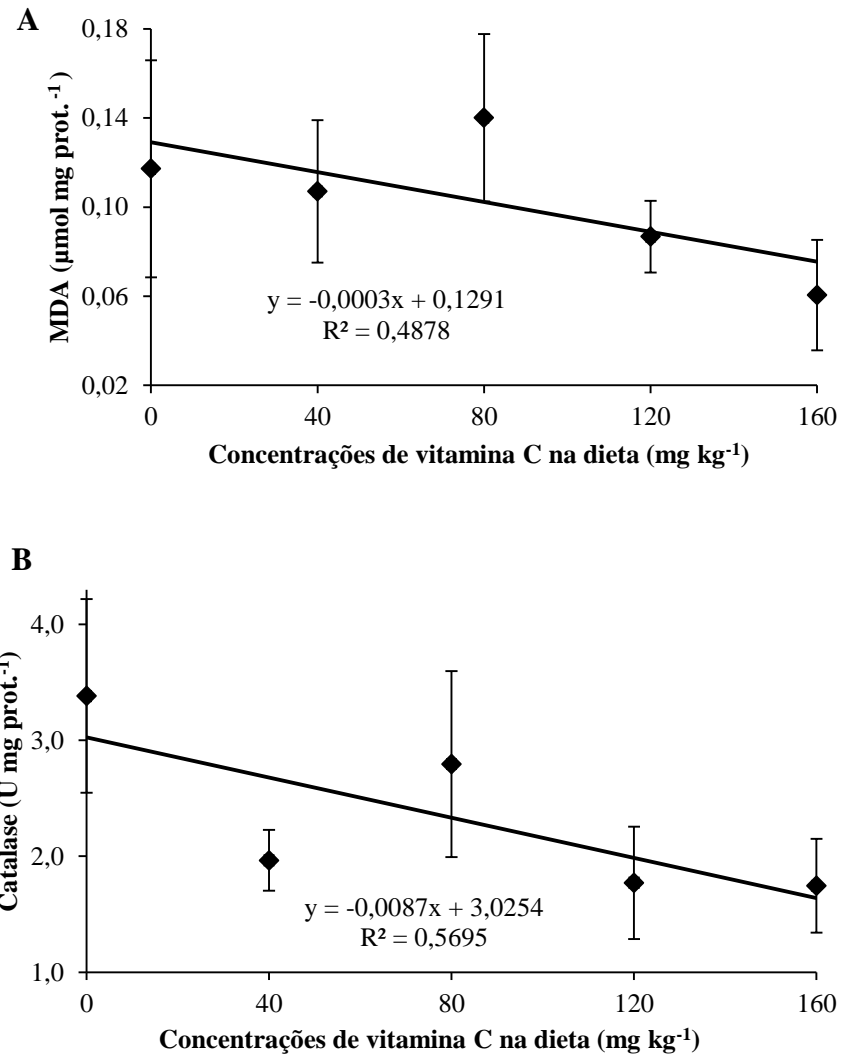


Fig. 2 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído – MDA (A) e da enzima catalase – CAT (B) (valores médios \pm desvio padrão), no fígado de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, não submetidos ao desafio.

3.2. Estresse oxidativo após o desafio pela exposição ao ar

Nas brânquias, houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano apenas para a variável de estresse oxidativo MDA (Tabela 5). Na concentração $0,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de óleo de orégano, não observamos efeito significativo ($p > 0,05$) da vitamina C sobre o MDA (Tabela 6). Entretanto, na concentração $1000,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de óleo de orégano houve efeito linear decrescente da vitamina C ($p \leq 0,05$) (Tabela 6, figura 3). Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) do óleo de orégano sobre o MDA apenas nas concentrações $40,0$ e $80,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C. Na concentração de $40,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C, os peixes alimentados com óleo de orégano apresentaram menor concentração de MDA em relação ao controle. Entretanto, na concentração de $80,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C, os peixes alimentados com óleo de orégano apresentaram maior valor de MDA em relação ao controle (Tabela 6). Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da vitamina C, bem como do óleo de orégano ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis de estresse oxidativo analisadas (Tabela 5).

No fígado, houve interação significativa ($p \leq 0,05$) entre a suplementação de vitamina C e o óleo de orégano apenas para a atividade da enzima GST (Tabela 7). Na concentração $0,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de óleo de orégano observamos efeito quadrático da vitamina C sobre a GST, com valor estimado que maximiza essa variável de $98,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C. Na concentração $1000,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de óleo de orégano houve efeito cúbico da vitamina sobre a GST (Tabela 8, figura 4 - A e B). Houve efeito significativo do óleo de orégano sobre a GST nas concentrações $40,0$ e $160,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C, em que, os peixes alimentados com óleo de orégano apresentaram maior valor de GST em relação aos que não foram alimentados (Tabela 8). Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) da vitamina C para todas as variáveis de estresse oxidativo analisadas (Tabela 7). Observamos efeito quadrático para PC e SOD, com valores estimados que minimizam essas variáveis de $91,3$ e $135,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de vitamina C, respectivamente (Figura 5 - B e C). Para MDA e CAT observamos efeito linear decrescente da vitamina C (Figura 5 - A e D). Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) do óleo de orégano para nenhuma das variáveis de estresse oxidativo analisadas (Tabela 7).

3.3. Glicose sanguínea

Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre a suplementação de vitamina C e o óleo de orégano, bem como do óleo de orégano sobre a glicose sanguínea (Tabela 7). Houve efeito linear decrescente ($p \leq 0,05$) da suplementação de vitamina C sobre a glicose sanguínea (Tabela 7, figura 6).

Tabela 5 – Valores médios das variáveis de estresse oxidativo nas brânquias de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio.

	Efeito da interação vitamina C e orégano	Efeito da vitamina C	Vitamina C (mg kg ⁻¹)					Efeito do óleo de orégano	Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)		CV (%)
			0,0	40,0	80,0	120,0	160,0		0,0	1000,0	
MDA (μmol mg prot. ⁻¹)	0,020	0,021	0,17	0,14	0,17	0,09	0,10	0,222	0,12	0,15	34,13
PC (nmol mL ⁻¹)	0,066	0,084	3,34	4,37	4,09	5,15	5,45	0,464	4,66	4,30	29,88
SOD (U mg prot. ⁻¹)	0,442	0,201	0,72	0,65	0,55	0,47	0,49	0,972	0,58	0,58	34,66
CAT (U mg prot. ⁻¹)	0,403	0,421	0,09	0,08	0,06	0,06	0,07	0,332	0,07	0,08	33,35
GST (μmol min ⁻¹ g ⁻¹)	0,256	0,570	1,97	2,01	1,97	2,04	2,71	0,142	1,89	2,40	42,49

MDA - Malondialdeído; PC - Proteína carbonilada; SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GST - Glutathiona S-transferase; CV - Coeficiente de variação experimental; p>0,05 - Não significativo pelo teste F.

Tabela 6 - Efeito da interação entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano sobre o malondialdeído (MDA) (valores médios), nas brânquias de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus*, submetidos ao desafio

Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)	Níveis de vitamina C (mg kg ⁻¹)					p-valor
	0.0	40.0	80.0	120.0	160.0	
0,0 ^{ns}	0,13a	0,18a	0,11a	0,09a	0,10a	0,161
1000,0 ¹	0,20a	0,10b	0,22b	0,10a	0,10a	0,004
p-valor	0,087	0,043	0,009	0,698	0,986	-

p>0,05 - Não significativo pelo teste F;

¹Efeito linear: $Y = -0,0005x + 0,1854$ ($R^2=0,26$);

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p>0,05).

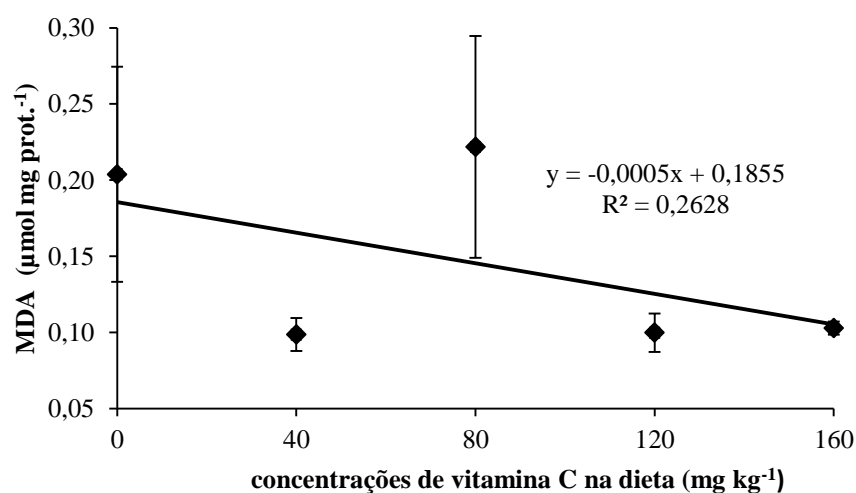


Fig. 3 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído (MDA) (valores médios ± desvio padrão) nas brânquias *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com 1000,0 mg kg⁻¹ de óleo de orégano, submetidos ao desafio.

Tabela 7 - Valores médios de glicose sanguínea e das variáveis de estresse oxidativo no fígado de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio.

	Efeito da interação vitamina C e orégano	Efeito da vitamina C	Vitamina C (mg Kg ⁻¹)					Efeito do óleo de orégano	Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)		CV (%)
			0,0	40,0	80,0	120,0	160,0		0,0	1000,0	
MDA ¹ (μmol mg prot. ⁻¹)	0,089	0,007	0,10	0,06	0,07	0,06	0,03	0,437	0,06	0,07	39,21
PC ² (nmol mL ⁻¹)	0,835	0,034	16,19	3,06	5,65	3,91	8,18	0,571	4,62	7,61	74,51
SOD ³ (U mg prot. ⁻¹)	0,912	<0,004	0,73	0,43	0,51	0,39	0,39	0,785	0,48	0,48	23,43
CAT ⁴ (U mg prot. ⁻¹)	0,703	<0,004	3,76	2,62	2,98	2,15	2,11	0,158	2,51	2,79	18,97
GST (μmol min ⁻¹ g ⁻¹)	0,010	0,005	4,22	7,88	6,27	8,88	6,96	0,077	6,39	7,44	25,84
Glicose ⁵ (mg dL ⁻¹)	0,138	<0,006	142,0	137,2	163,1	103,8	102,0	0,308	133,40	120,03	16,67

MDA - Malondialdeído; PC - Proteína carbonilada; SOD - Superóxido dismutase; CAT - Catalase; GST - Glutathione S-transferase; CV - Coeficiente de variação experimental;

p>0,05 - Não significativo pelo teste F.

¹ Efeito linear: $Y = -0,00030x + 0,08844$ ($R^2=0,63$);

² Efeito quadrático: $Y = 0,0012x^2 - 0,2295x + 13,2857$ ($R^2=0,69$).

³ Efeito quadrático: $Y = 0,000017x^2 - 0,0046x + 0,6828$ ($R^2=0,79$);

⁴ Efeito linear: $Y = -0,0089x + 3,4113$ ($R^2=0,73$).

⁵ Efeito linear: $Y = -0,3025x + 153,4541$ ($R^2=0,50$)

Tabela 8 - Efeito da interação entre a suplementação de vitamina C e óleo de orégano sobre a atividade da glutatona S-transferase (GST) (valores médios), no fígado de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus*, submetidos ao desafio

Óleo de orégano (mg kg ⁻¹)	Níveis de vitamina C (mg kg ⁻¹)					p-valor
	0.0	40.0	80.0	120.0	160.0	
0,0 ¹	4,06a	5,24a	7,14a	9,58a	5,14a	0,016
1000,0 ²	4,32a	10,52b	5,40a	8,18a	8,78b	0,003
p-valor	0,875	0,002	0,250	0,349	0,022	-

p>0,05 - Não significativo pelo teste F;

¹ Efeito quadrático: $Y = -0,0005x^2 + 0,0986x + 3,1313$ ($R^2=0,65$);

² Efeito cúbico: $Y = 0,0000x^3 - 0,0030x^2 + 0,2038x + 4,7415$ ($R^2=0,52$);

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (p>0,05).

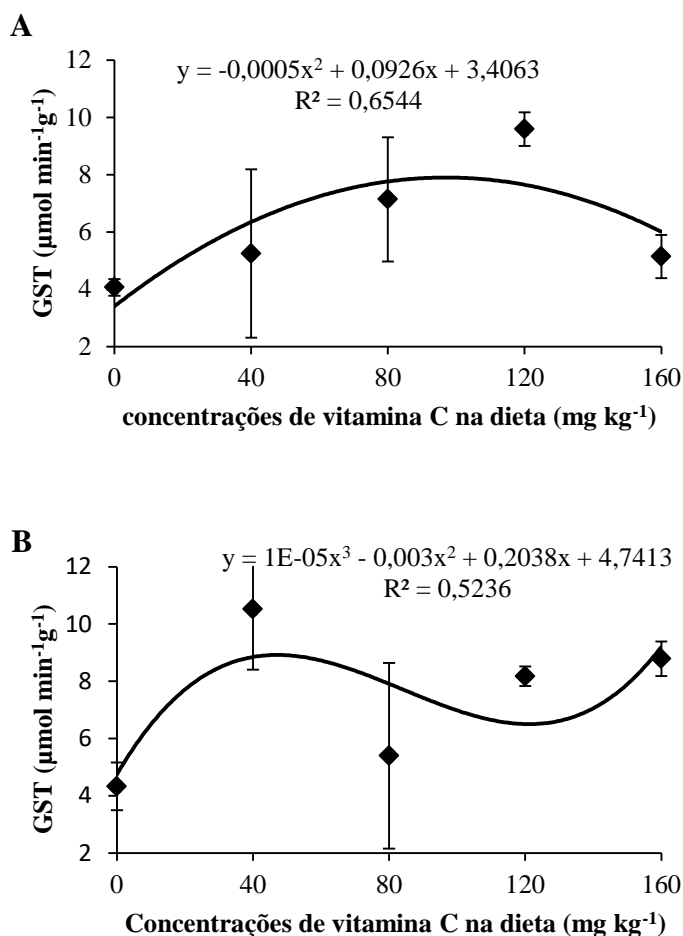


Fig. 4 - Efeito da vitamina C sobre a atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) (valores médios \pm desvio padrão) no fígado de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com 0,0 mg kg⁻¹(A) e 1000,0 mg kg⁻¹ (B) de óleo de orégano, submetidos ao desafio.

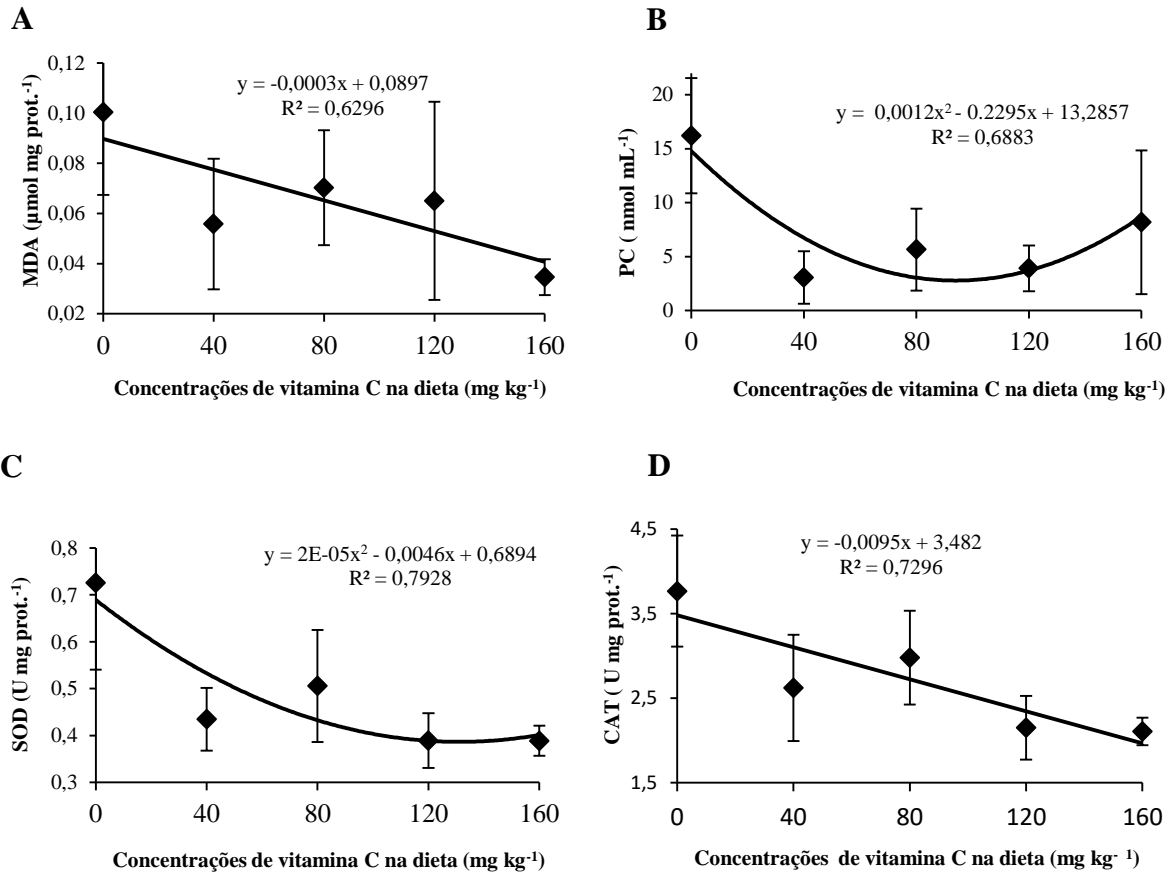


Fig. 5 - Efeito da vitamina C sobre o malondialdeído – MDA (A), a proteína carbonilada – PC (B) e a atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (C), catalase – CAT (D) (valores médios \pm desvio padrão), no fígado de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio pela exposição ao ar.

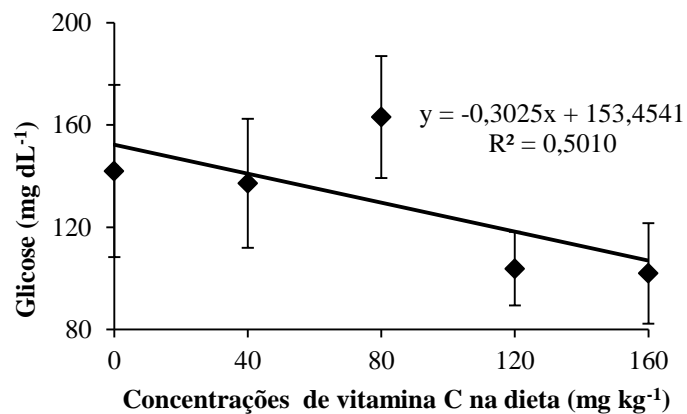


Fig. 6 - Efeito da vitamina C sobre a glicose sanguínea (valores médios \pm desvio padrão) de juvenis de *Astyanax aff. bimaculatus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C e óleo de orégano, submetidos ao desafio.

4. Discussão

A vitamina C e o orégano causaram redução dos danos oxidativos e aumento das defesas antioxidantes nos peixes tanto antes quanto após a exposição ao ar. Entretanto, só houve interação entre estes antioxidantes nos peixes expostos ao ar. Esse efeito, provavelmente, ocorreu devido a maior formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nessas condições (Paital, 2013). Assim, a neutralização das ROS foi mais efetiva na presença dos dois antioxidantes apenas quando os danos oxidativo foram maiores. A exposição ao ar causa estresse oxidativo devido à falta de suprimento de oxigênio nas brânquias (Paital, 2013). Nessas condições, a resposta mais comum é o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, que pode ocorrer com o aumento da síntese, ativação e/ou diminuição de sua degradação. Essa é uma estratégia fisiológica que prepara o animal contra o estresse oxidativo durante a reoxigenação (Welker, Moreira, Campos & Hermes-Lima, 2013), quando os peixes retornam para a água e a ventilação branquial é restabelecida.

A redução da concentração do MDA no fígado e da atividade da SOD nas brânquias e da CAT no fígado dos peixes, antes da exposição ao ar, indica que a vitamina C atuou contra a peroxidação lipídica por meio da neutralização de radicais livres, como observado por Frei et al. (1989). Assim, quanto maior a concentração de vitamina C na dieta, maior a capacidade de neutralização dos ROS e menor a necessidade de ativação das enzimas antioxidantes. Dessa forma, a adequada suplementação de vitamina C em dietas para peixes pode reduzir o gasto energético com a ativação e síntese de enzimas antioxidantes, e consequente economia de energia para outros processos fisiológicos e para o crescimento.

Antes da exposição ao ar, o orégano também apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo pela diminuição de MDA no fígado e proteínas carboniladas nas brânquias. Esse efeito deve ter ocorrido em função da capacidade do orégano neutralizar radicais livres (Cervato et al., 2000). Apesar de ser lipossolúvel, e, portanto, atuar, principalmente, contra a peroxidação lipídica, o orégano também pode neutralizar radicais livres presentes no citoplasma (Cervato et al., 2000) o que explica a redução das proteínas carboniladas. Isso se deve, provavelmente, à sua capacidade de se ligar a proteínas no citoplasma, como observado para a vitamina E no fígado e no coração de coelho (Dutta-Roy et al., 1993). Além disso, o aumento na atividade da GST no fígado indica que o orégano também reduz ROS pela ativação dessa enzima. Apesar de não haver estudos que comprovam a estimulação do orégano sobre a atividade da GST,

outros estudos demonstraram que o orégano ativa o fator de transcrição gênica Nrf2, que determina a expressão de enzimas antioxidantes como a Cu / Zn-superóxido dismutase (SOD1) e g-glutamilcisteína ligase (GCLC, GLCM) (Zou, Wang, Peng & Wei, 2016a). O aumento da atividade de enzimas antioxidantes, com concomitante redução da peroxidação lipídica, causados pelo orégano, também foi observado por Gümüs et al., (2017), o que é um indício que o orégano modula a atividade dessas enzimas de forma independente de sua ação na neutralização de radicais livres. Resultados semelhantes foram observados por Zou, Xiang, Wang, Wei & Peng (2016b), com redução de TBARs e aumento da atividade da SOD e glutathione peroxidase (GPx) em porcos após o transporte, alimentados com dietas suplementadas com óleo de orégano.

Após a exposição dos peixes ao ar, a vitamina C só promoveu redução na concentração de MDA nas brânquias na presença de orégano, o que indica efeito sinérgico entre antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis contra a peroxidação lipídica. A vitamina C, por ser hidrossolúvel, protege as membranas celulares, neutralizando os radicais livres presentes no citoplasma, antes de iniciar a peroxidação (Frei et al., 1989). O orégano, por ser lipossolúvel, complementa a ação da vitamina C, neutralizando os radicais livres durante a fase de propagação em cadeia (Cervato et al., 2000).

A redução da concentração do MDA e da proteína carbonilada no fígado, juntamente com a redução da atividade das enzimas SOD e CAT, após exposição ao ar indica que a vitamina C atuou contra a peroxidação lipídica apenas por meio da neutralização de radicais livres (Frei et al., 1989). Entretanto, o aumento na atividade da GST indica que a vitamina C também reduziu os danos oxidativos pela ativação dessa enzima.

A redução da atividade da GST nos níveis mais altos de vitamina C, na ausência de orégano indica que essa foi capaz de neutralizar os radicais livres, sem a necessidade de ativação dessa enzima. Nos níveis mais baixos de vitamina C, a redução da peroxidação lipídica e das proteínas carboniladas deve ter ocorrido tanto pela neutralização dos radicais livres como pela ativação da GST. Portanto, a concentração de vitamina C influencia seus mecanismos de atuação, sendo, provavelmente a neutralização dos ROS a principal forma de proteção contra os danos oxidativos. Na presença de orégano, os efeitos da vitamina C sobre a atividade da GST foram semelhantes aos observados na ausência de orégano. Porém, nos níveis mais altos de vitamina C a atividade da GST tende a aumentar, o que poderia indicar efeito pró-

oxidante. Entretanto, os níveis de MDA e proteínas carboniladas não aumentaram, indicando que não houve efeito pró-oxidante.

A exposição ao ar em peixes desencadeia a liberação de cortisol pelo tecido inter-renal e, conseqüentemente, desencadeia as respostas secundárias de estresse como o aumento da glicose, do ácido láctico e alterações na osmolaridade sanguínea (Lim & Hur, 2018). A elevação do cortisol, também, causa aumento da taxa metabólica, com maior formação de radicais livres durante a respiração celular (Costantini et al., 2012). Neste estudo, a vitamina C apresentou efeito redutor das respostas de estresse (redução da glicose sanguínea) e protetor contra os danos oxidativos. Assim, a vitamina C deve ter atuado tanto na redução da formação de ROS, como pela sua neutralização.

A redução do MDA, SOD e CAT pela vitamina C e a redução da PC e aumento da GST pelo orégano, nos peixes que não foram expostos ao ar indica que esses antioxidantes apresentaram efeitos complementares na prevenção dos danos oxidativos que ocorrem durante os manejos de rotina na piscicultura, como biometrias, classificações e transporte. Entretanto, em condições de desafio por exposição ao ar, a suplementação conjunta de um antioxidante hidrossolúvel (vitamina C) e um lipossolúvel (óleo de orégano) foi mais eficiente na proteção contra o estresse oxidativo, do que o efeito de cada antioxidante isoladamente, o que indica efeito sinérgico. Portanto, recomendamos a suplementação simultânea de 160 mg kg⁻¹ de vitamina C e 1000 mg kg⁻¹ de óleo de orégano na dieta.

5. Referências bibliográficas

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- 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.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1986). Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, 19(7), 194-201.
- Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B. (2000). Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) Leaf extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 24(6), 453-465.
- Chen, Y. J., Yuan, R. M., Liu, Y. J., Yang, H. J., Liang, G. Y., & Tian, L. X. (2015). Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 435, 431-436.
- Costantini, D., Ferrari, C., Pasquaretta, C., Cavallone, E., Carere, C., von Hardenberg, A., & Réale, D. (2012). Interplay between plasma oxidative status, cortisol and coping styles in wild alpine marmots, *Marmota marmota*. *Journal of Experimental Biology*, 215(2), 374-383.
- Detmann, E., Souza, M.D., Valadares Filho, S.D.C., De Queiroz, A.C., Berchielli, T.T., Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M., Azevedo, J. A.G. (2012). *Métodos para Análise de Alimentos*, Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 214.

- Dieterich, S., Bielick, 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*(1), 33-39.
- Dorman, H. D., Surai, P., & Deans, S. G. (2000). In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research*, *12*(2), 241-248.
- Dutta-Roy, A. K., Gordon, M. J., Leishman, D. J., Paterson, B. J., Duthie, G. G., & James, W. P. (1993). Purification and partial characterisation of an α -tocopherol-binding protein from rabbit heart cytosol. *Cellular Fatty Acid-Binding Proteins II*, 139-144. Springer, Boston, MA.
- Ferreira, P. M. F., Caldas, D. W., Salaro, A. L., Sartori, S. S., Oliveira, J. M., Cardoso, A. J., & Zuanon, J. A. (2016). Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *88*(2), 911-922.
- Frei, B., England, L., & Ames, B. N. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(16), 6377-6381.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B. T., & Mamauag, R. E. (2013). Effect of dietary oxidized fish oil and vitamin C supplementation on growth performance and reduction of oxidative stress in Red Sea Bream *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*, *19*(1), 35-44.
- Gümüş, R. Erol, H. S., Imik, H., & Halice, M. (2017). The Effects of the Supplementation of Lamb Rations with Oregano Essential Oil on the Performance, Some Blood Parameters and Antioxidant Metabolism in Meat and Liver Tissues. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *23*(3).
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, *249*, 7130-7139.
- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K., & Lie, Ø. (1997). Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(1-2), 137-149.

- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., & Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(5), 357-362.
- Levin, R. L. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 233, 346-357.
- Lim, H. K., & Hur, J. W. (2018). Effects of Acute and Chronic Air Exposure on Growth and Stress Response of Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 143-151.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., & Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), R100-R107.
- Machlin, L. J., & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- May, J. M., & Qu, Z. C. (2005). Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1), 178-186.
- Miranda, E. C., Pezzato, A. C., Pezzato, L. E., & Furuya, W. M. (2000). Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, 22(3), 669-675.
- Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutierrez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1568-1575.
- Paital, B. (2013). Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 69-77.
- Pereira-da-Silva, E. M., & Oliveira, R. H. F. (2016). Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000) to air exposure. *Aquaculture Research*, 48(6), 3268-3271.

- Popma, T., & Masser, M. (1999). Tilapia, life history and biology. *Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication*, United States Department of Agriculture, 283, 4.
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., de Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L. T., & Euclides, R. F. (2011). *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos – Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 252p.
- Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, E. G., & Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4), 384-404.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Zaniboni-Filho, E., & Pedrosa, R. C. (2005). Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 244(1-4), 349-357.
- Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., & Honermeier, B. (2016). Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare L.*) collection of the German National Genebank. *Industrial Crops and Products*, 92, 19-25.
- Zhang, T., Zou, Y., Hu, X. M., Zheng, L. F., Wei, H. K., Giannenas, I., Jin, L. Z., Peng, J., Jiang, S. W. (2015). Effects of dietary oregano essential oil supplementation on the stress response, antioxidative capacity, and HSPs mRNA expression of transported pigs. *Livestock Science*, 180, 143–149.
- Zou, Y., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016a). Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Wei, H., & Peng, J. (2016b). Effects of oregano essential oil or quercetin supplementation on body weight loss, carcass characteristics, meat quality and antioxidant status in finishing pigs under transport stress. *Livestock Science*, 192, 33-38.

ANEXO 1: Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais de produção (CEUAP).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 28/04/2014

CERTIFICADO

A comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa certifica que o **processo nº 46/2014**, intitulado “**Vitamina C e óleo de orégano em dietas 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 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em **22/Abr/2014**.

CERTIFICATE

The ethic commission in use of production animals of universidade federal de viçosa certifies that the **process number 46/2014**, named “**Vitamin C and oregano oil in diets for the yellow tail tetra (*Astyanax altiparanae*)**”, coordinated by **prof(a). Jener Alexandre Sampaio Zuanon**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and with actual Brazilian legislation, and was approved by this commission on **Apr, 22th, 2014**.

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV