

GUSTAVO AUGUSTO DE CARVALHO

**ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ-PIMENTA (*Mentha piperita*) COMO
PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIA-DO-
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

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*.

Orientadora: Ana Lúcia Salaro

Coorientadores: Bernardo Baldisserotto

Jener Alexandre Sampaio Zuanon

Pollyana de Moraes França Ferreira

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C331o
2020

Carvalho, Gustavo Augusto de, 1994-
Óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) como
promotor de crescimento em dietas para juvenis de
tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Gustavo Augusto de
Carvalho. – Viçosa, MG, 2020.
80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Lúcia Salaro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) - Crescimento. 2. Mentol. 3. Alimentos -
Aditivo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 597.74

GUSTAVO AUGUSTO DE CARVALHO

**ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ-PIMENTA (*Mentha piperita*) COMO
PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

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: 24 de julho de 2020.

Assentimento:



Gustavo Augusto de Carvalho

Autor



Ana Lúcia Salaro

Orientadora

A Deus, por ter me concedido o dom da vida.
Aos meus pais, Maria Estela Augusta de Carvalho e Antônio Carlos de Carvalho
pela educação, carinho e suporte.
À Eneida Stephanie Pereira dos Santos Carvalho Costacurta de Aguiar, fiel
companheira com amor incondicional.
Aos meus irmãos e amigos, pelo apoio e lealdade em todos os momentos.
Dedico.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*É com imensa gratidão que agradeço à minha orientadora **Ana Lúcia Salaro**, por todos os ensinamentos e conselhos que levarei para a vida. Obrigado por me confiar esse projeto de grande relevância científica e por me estimular a contínua busca por conhecimento. Sinto-me honrado por essa oportunidade enriquecedora que me proporcionou tanto amadurecimento profissional, quanto pessoal. Espero que no futuro possamos trabalhar juntos novamente. Você é uma pessoa brilhante e sua luz estará sempre acesa na minha jornada.*

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**, pela oportunidade de realizar este curso, por toda a estrutura e suporte técnico fornecido;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudo para o mestrado;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** pelo financiamento do projeto durante o mestrado;

À **FAPEMIG** pela concessão de bolsa para o desenvolvimento do projeto de iniciação científica durante a minha graduação na Zootecnia, dando início ao meu sonho;

À **Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Salaro**, pela orientação durante a graduação e o mestrado, pelos ensinamentos, conselhos, confiança, paciência e esforço depositados durante a realização deste projeto de pesquisa;

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto**, por toda contribuição na realização deste projeto de pesquisa;

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Jener Sampaio Zuanon**, pelos ensinamentos, discussões e conselhos durante a realização deste projeto de pesquisa;

À minha coorientadora **Prof.^a Dr.^a Pollyanna de Moraes França Ferreira**, pelos ensinamentos, contribuições e colaboração durante o desenvolvimento do projeto;

Ao **Dr. Alexmiliano Vogel de Oliveira**, pelos ensinamentos, contribuições, colaboração durante o desenvolvimento do experimento;

Ao **Prof. Dr. Daniel Abreu Vasconcelos Campelo**, pelas enriquecedoras contribuições neste trabalho;

Aos amigos da pós-graduação, a doutoranda **M.Sc. Cristiana Leonor da Silva Carneiro** e **M.Sc. André Luis Souza Modesto**, por toda ajuda prestada, pelos conselhos e brincadeiras que tornaram o curso do mestrado mais leve;

Ao companheiro e técnico **M.Sc. André Luiz Fialho Ladeira**, pela disposição, auxílio e ensinamentos, principalmente durante a coleta de sangue dos peixes;

Aos bolsistas de iniciação científica **Rafael Rusth Costa Teixeira** e **João Felipe Ribeiro Maciel**, que me ajudaram muito em todos os momentos, pela companhia em todo o decorrer deste projeto tornando o trabalho e o cotidiano mais tranquilo, sou muito grato a vocês;

À equipe do Laboratório de Nutrição e Produção de Peixes (LaNuP) do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal da UFV, especialmente os estagiários **Alessandro Gomes Quadros Sebastião**, **Érica Caroline Almeida**, **Iago Rafael Egito de Sousa** e **Nilton Júnior Teixeira Martins**, pela amizade, auxílio na condução do trabalho e os momentos alegres e aos estudantes **Carlos Augusto Freitas Silva** e **Lírica Alves Fonseca Hott** que me auxiliaram na condução do experimento quando estagiavam no LaNuP;

Aos mestres em Biologia Animal, **M.Sc. José Carlos de Oliveira Júnior** e **M.Sc. William Chaves** pela amizade e ajuda prestada;

À **Prof.^a Dr.^a Mariella Bomtempo Duca de Freitas**, pela disponibilização do Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV para as análises laboratoriais. À sua orientanda do mestrado **Renata Maria Pereira de Freitas**, pelo auxílio durante as análises;

À **Prof.^a Dr.^a Reggiani Vilela Gonçalves**, por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Biologia Animal da UFV para realização das análises laboratoriais. À sua orientanda do pós-doutorado, **Dr.^a Mariáurea Matias Sarandy** e a técnica responsável do laboratório **Maria Lúcia de Almeida**, pela disponibilidade e ajuda nas análises;

À **Prof.^a Dr.^a Josefina Bressan**, por disponibilizar o Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV para realização das análises plasmáticas, e à técnica responsável do laboratório **Dr.^a Solange Mara Bigonha**, pela ajuda durante as análises e avaliação das variáveis plasmáticas;

À **Prof.^a Dr.^a Maria Goreti de Almeida Oliveira**, por disponibilizar o Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), e pela parceria nas análises das enzimas digestivas. E à sua orientanda, a doutoranda **M.Sc. Yaremis Beatriz Meriño Cabrera** por todos ensinamentos, auxílio e supervisão durante as análises e avaliação das variáveis das enzimas digestivas.

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

dietas e das carcaças. Aos técnicos do laboratório **Dr. Mateus Dias Nunes** e **Mario Rita Julião**, pelo auxílio e disposição durante a realização das análises;

Ao **Prof. Dr. Antônio Policarpo Souza Carneiro** do Departamento de Estatística da UFV, pelos ensinamentos, auxílio e esforço prestado durante a análise estatística deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos** por disponibilizar o Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE) do Departamento de Biologia Animal da UFV, para o preparo e armazenamento das amostras biológicas;

A todos **professores** que contribuíram para minha formação durante o curso de graduação e de mestrado;

À banca examinadora o **Dr. Alexmiliano Vogel de Oliveira**, o **Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto** e o **Prof. Dr. Daniel Abreu Vasconcelos Campelo**;

À empresa **Bioclin/Quibasa®** por intermédio do programa **Bioclin Educar**, pela doação de reagentes para análises laboratoriais;

À empresa **Labsynth®** pela doação de reagente para análise laboratorial;

Aos integrantes e colegas do Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura (LAFAP), à **M.Sc. Jheneze Guimarães Pereira Rocha**, pelo auxílio durante as análises e os mestrandos **Juliana Rodrigues Gomes** e **Felipe Martins dos Santos**, por todo auxílio e brincadeiras que deixaram os momentos do meu dia mais leves;

Aos funcionários do Setor de Piscicultura do Departamento da Biologia Animal da UFV, **João Antônio de Oliveira** e **José Francisco Delfino** pelo auxílio, conselhos e momentos de descontração durante o experimento de mestrado;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal da UFV, os secretários **Lúcia Helena Campos**, **Nilo Sérgio de Souza** e **Adenilson Antônio Brasileiro**, por sempre estarem dispostos a ajudar e resolver problemas. Ao **Helvécio de Freitas**, ao **Geraldo Pereira Filho** e ao **Donizete Aparecido da Silva**, por sempre estarem dispostos, pelas conversas e conselhos;

A meus pais, **Maria Estela Augusta de Carvalho** e **Antônio Carlos de Carvalho**, pelo carinho, orações, suporte, conselhos, educação, e o incentivo para a realização dos meus sonhos;

À minha esposa, **Eneida Stephanie Pereira dos Santos Carvalho Costacurta de Aguiar**, por seu amor, companheirismo, suporte nos momentos difíceis, admiração e por fazer parte deste sonho;

Aos meus irmãos **Daniel Augusto de Carvalho** e **André Augusto de Carvalho**, por serem meus melhores amigos, parceiros e sempre estarem por mim em todos os momentos;

A todos os familiares e demais amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“A maior recompensa pelo trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”. (John Ruskin)

RESUMO

CARVALHO, Gustavo Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) como promotor de crescimento em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Orientadora: Ana Lúcia Salaro. Coorientadores: Bernardo Baldisserotto, Jener Sampaio Zuanon e Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Os óleos essenciais são compostos biodegradáveis ricamente concentrados em metabólitos secundários de plantas aromáticas que apresentam potencial para serem utilizados como promotores de crescimento para peixes. Dentre as plantas utilizadas como fonte de óleo essencial, a hortelã-pimenta, *Mentha piperita*, se destaca pelas suas propriedades estimuladoras de enzimas digestivas e sobre a saúde e integridade do trato gastrointestinal melhorando a capacidade de absorção de nutrientes. Objetivou-se avaliar com o presente estudo os efeitos do óleo essencial de hortelã-pimenta (OEP) na dieta de tilápia-do-Nilo sobre desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos, atividade das enzimas digestivas e composição química da carcaça. Para tal, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos os quais consistiram de dietas isoproteicas (313,60 g kg⁻¹) e isocalóricas (4565,31 kcal kg⁻¹) contendo diferentes níveis de OEP (0,00; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 e 1,20 g kg⁻¹) com seis repetições. 840 juvenis de tilápia-do-Nilo (0,58 ± 0,13g) foram distribuídos em 42 aquários (70 L) e foram alimentados nos horários 8:00, 11:00, 14:00 e 17:00 horas, durante oito semanas. Ao final do período experimental foram avaliados nos peixes os índices de desempenho produtivo, para os parâmetros bioquímicos foi avaliado o metabolismo energético e a atividade das enzimas metabólicas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e a lactato desidrogenase (LDH), a atividade das enzimas digestivas proteases totais, lipase e amilase e a composição química da carcaça. O maior ganho de peso e taxa de crescimento específico ($p < 0,05$) foram observados nos peixes que receberam 1,20 g kg⁻¹ de OEP. A conversão alimentar e a eficiência alimentar foram melhores ($p < 0,05$) nos peixes que receberam os níveis 0,00 e 1,00 g kg⁻¹ de OEP. A maior taxa de eficiência proteica ($p < 0,05$) foi observada nos peixes que receberam os níveis 0,20, 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP na dieta. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a taxa de sobrevivência, para os índices hepatossomáticos e viscerossomáticos e para o rendimento de carcaça. Maiores concentrações ($p < 0,05$) de glicogênio hepático foram observadas em peixes que se alimentaram com dietas contendo os níveis 0,00; 0,20 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP, e maiores concentrações ($p < 0,05$) de glicogênio muscular foram observadas nos peixes que receberam o nível 0,40 g kg⁻¹ de OEP.

Foram observadas nos animais as maiores concentrações ($p < 0,05$) de glicose com o nível 0,80 g kg⁻¹ de OEP na dieta, e de lactato com os níveis de 0,40 a 1,00 g kg⁻¹ de OEP na dieta. A menor concentração ($p < 0,05$) de colesterol total foi observada nos peixes que receberam a dieta controle (0,00 g kg⁻¹ de OEP). As menores concentrações ($p < 0,05$) de triglicerídeos e de HDL foram observadas nos peixes que receberam os níveis 0,00; 0,80; 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP. Enquanto que os peixes apresentaram as menores concentrações ($p < 0,05$) de LDL foram se alimentaram com as dietas contendo os níveis 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP. A enzima AST apresentou menor atividade ($p < 0,05$) nos animais com o nível 0,60 g kg⁻¹ de OEP na dieta. A atividade da enzima ALT foi menor ($p < 0,05$) nos peixes que se alimentaram com os níveis 0,00; 0,20; 0,80; 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP na dieta. A atividade da enzima LDH foi menor ($p < 0,05$) nos peixes que receberam os níveis 0,00; 0,20; 0,40; 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP. A maior atividade ($p < 0,05$) das enzimas proteases totais foi observada nos peixes que receberam a dieta com 1,00 g kg⁻¹ de OEP, a da lipase com os níveis de 1,00 e 1,20 g kg⁻¹ de OEP e a da amilase com 1,20 g kg⁻¹ de OEP. A composição química da carcaça não apresentou diferença ($p > 0,05$) para matéria seca, energia e cinzas. Observou-se maior teor de proteína bruta ($p < 0,05$) nos peixes que receberam o nível com 1,20 g kg⁻¹ de OEP e o menor teor de extrato etéreo ($p < 0,05$) foi observado em todos os peixes que se alimentaram com as dietas contendo a inclusão do OEP. Dessa forma, conclui-se que o OEP age como promotor de crescimento para juvenis de *Oreochromis niloticus* no nível de 1,20 g kg⁻¹.

Palavras-chave: Fitoaditivo. Aditivo alimentar. Mentol. Protease. Lipase. Amilase.

ABSTRACT

CARVALHO, Gustavo Augusto de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Peppermint essential oil (*Mentha piperita*) as growth promoter in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Adviser: Ana Lúcia Salaro. Co-advisers: Bernardo Baldisserotto, Jener Sampaio Zuanon and Pollyanna de Moraes França Ferreira.

Essential oils are biodegradable concentrated compounds obtained from aromatic plants and they are rich in secondary metabolites from plants. Which have a potential to be used as growth promoter for fish. Among the plants used as a source of essential oil, the peppermint (*Mentha piperita*) has properties on the stimulation of digestive enzymes and on the integrity and health of the gastrointestinal tract improving the assimilation of nutrients by the fish. The aim of this study is to evaluate the essential oil of *Mentha piperita* (OEP) as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth promoter and its effects on growth performance, biochemical parameters, digestive enzymes, and carcass chemical composition. A completely randomized design was used with seven treatments consisted with isoproteic (313.60 g kg^{-1}) and isocaloric ($4565.31 \text{ kcal kg}^{-1}$) diets containing different levels of OEP (0.00; 0.20; 0.40; 0.60; 0.80; 1.00 and 1.20 g kg^{-1}) and six replicates. 840 juveniles of Nile tilapia ($0.58 \pm 0.13\text{g}$) were distributed in 42 tanks (70 L) and they were fed in the hours 8:00, 11:00, 14:00 and 17:00 for eight weeks. At the end of experiment trial the growth performance, the biochemical parameters as the energetic metabolism and metabolic enzymes activity aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH), the digestive enzymes activity of total protease, lipase and amylase and the carcass chemical composition were evaluated in the fishes. The higher values ($p < 0.05$) of weight gain and specific growth rate were observed in fish fed 1.20 g kg^{-1} OEP. The reduction of values ($p < 0.05$) of feed conversion ratio and the higher value of feed efficiency ($p < 0.05$) were recorded in fish fed 0.00 and 1.00 g kg^{-1} OEP. The higher ($p < 0.05$) protein efficiency rate was observed in fishes that received 0.20, 1.00 and 1.20 g kg^{-1} OEP. No significant difference ($p > 0.05$) in the survival rate, hepatosomatic index, viscerosomatic index and carcass yield were recorded. The increase of concentration ($p < 0.05$) of hepatic glycogen was observed in fish fed 0.00, 0.20 and 1.20 g kg^{-1} OEP, and for the muscular glycogen the higher concentration ($p < 0.05$) was in fish fed 0.40 g kg^{-1} OEP. An increase in glucose concentration ($p < 0.05$) was observed in fish fed 0.80 g kg^{-1} OEP. The higher values of lactate concentration ($p < 0.05$) were recorded in fish fed 0.40 to 1.00 g kg^{-1} OEP. The total cholesterol reduction ($p < 0.05$) was observed in fishes that received the control diet (0.00 g kg^{-1} OEP). The triglyceride and HDL reduction ($p < 0.05$) were recorded in fish

fed 0.00, 0.80, 1.00 and 1.20 g kg⁻¹ OEP. The LDL concentration reduction ($p < 0.05$) was observed in fish fed 1.00 and 1.20 g kg⁻¹ OEP. The activity reduction of AST ($p < 0.05$) was observed in fish fed 0.60 g kg⁻¹ OEP, and the activity reduction of ALT ($p < 0.05$) was show in fishes that received the diets containing 0.00, 0.20, 0.80, 1.00 and 1.20 g kg⁻¹ OEP. The reduction of LDH activity ($p < 0.05$) was recorded in fish fed 0.00, 0.20, 0.40, 1.00 and 1.20 g kg⁻¹ OEP. An increase of total protease activity ($p < 0.05$) was observed in fishes that received diets containing 1.00 g kg⁻¹ OEP. The lipase activity ($p < 0.05$) was increased in fishes fed 1.00 and 1.20 g kg⁻¹ OEP and the increase of amylase activity ($p < 0.05$) was observed in fish fed 1.20 g kg⁻¹ OEP. The dietary OEP has no significant effect ($p > 0.05$) on dry matter, crude energy and ashes of carcass chemical composition. Diets containing 1.20 g kg⁻¹ OEP ($p < 0.05$) increased the crude protein content of carcass and all levels of OEP inclusion in the diets ($p < 0.05$) reduced the crude lipid content of carcass of the fishes. In conclusion, the level of 1.20 g kg⁻¹ OEP can act as growth promoter of juveniles of *Oreochromis niloticus* when used as a supplement in diets.

Keywords: Phytoadditive. Feed additive. Menthol. Protease. Lipase. Amylase.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – ARTE DA PESQUISA

Figura 1 - Diagrama ilustrando o método por destilação a vapor. (Adaptado de: Tongnuanchan & Benjakul, 2014) 29

Figura 2 - Estrutura dos monoterpenos do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) (Fonte: Freire, 2006)..... 33

CAPÍTULO 2 – Dietary supplementation with *Mentha piperita* essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia

Figure 1 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on weight gain (A), feed conversion rate (B), feed efficiency (C), specific growth rate (SGR) (D) and protein efficiency rate (PER) (E) of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$) 59

Figure 2 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on the concentration of hepatic glycogen (A) and muscle glycogen (B) in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)..... 61

Figure 3 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on glucose (A), lactate (B), total cholesterol (C), triglycerides (D), high-density lipoprotein (HDL) (E) and low-density lipoprotein (LDL) (F) plasma concentrations in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)..... 62

Figure 4 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on aspartate transaminase (AST) (A), alanine aminotransferase (ALT) (B) and lactate dehydrogenase (LDH) (C) plasma concentrations in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$) 63

Figure 5 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on total proteases (A), lipase (B) and amylase (C) in the intestine of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)..... 66

Figure 6 - Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on carcass concentration of crude protein (A) and ether extract (B) of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)..... 68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – ARTE DA PESQUISA

Tabela 1 - Vegetais utilizados para obtenção de extrato vegetal, partes utilizadas da planta para extração, principais constituintes e suas propriedades nos seres vivos 27

Tabela 2 - Ação dos óleos essenciais como aditivo em dietas para peixes 32

Tabela 3 - Principais constituintes do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)... 33

CAPÍTULO 2 – Dietary supplementation with *Mentha piperita* essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia

Table 1 - Formulation diets (g kg^{-1}) supplemented with peppermint essential oil (EOP) 52

Table 2 - Chemical composition (based on dry matter) of diets supplemented with peppermint essential oil (EOP). 53

Table 3 - Survival rate (SR), weight gain (WG), feed conversion (FC), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR), protein efficiency rate (PER), hepatosomatic index (HI), viscerosomatic index (VI) and carcass yield (CY) (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks 58

Table 4 - Concentrations (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of hepatic and muscle glycogen, glucose, lactate, total cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) and activities of aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks. 60

Table 5 - Digestive enzymes activities (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks. 65

Table 6 - Whole-body chemical composition (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) fed with diets containing different levels of peppermint <i>M. piperita</i> essential oil (EOP) after eight weeks	67
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
CAPÍTULO 1 – ARTE DA PESQUISA	21
<i>Produção intensiva e os promotores de crescimento na criação de peixes</i>	22
<i>Óleos essenciais e a hortelã-pimenta na produção de peixes</i>	29
<i>Produção de tilápia-do-Nilo</i>	36
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2 – Dietary supplementation with <i>Mentha piperita</i> essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia	47
Dietary supplementation with <i>Mentha piperita</i> essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia ...	48
ABSTRACT	48
1 Introduction	49
2 Materials and methods.....	50
2.1 Ethics statement	50
2.2 Experimental design and diets	50
2.3 Fish and experimental conditions	54
2.4 Sampling collection	54
2.5 Growth performance	55
2.6 Biochemical parameters	55
2.7 Digestive enzyme activity	55
2.8 Whole-body composition.....	56
2.9 Statistical analyses	56
3 Results	56
3.1 Growth performance	56
3.2 Biochemical parameters.....	57

3.3 Digestive enzyme activities	64
3.4 Whole-body composition.....	64
4 Discussion.....	69
5 References	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento acelerado da aquicultura com relação a outros setores da produção animal observado nos últimos anos (FAO, 2020) está relacionado com alguns fatores como a intensificação dos sistemas de cultivo e a utilização de dietas formuladas. Em tais dietas podem ser incluídos aditivos alimentares que promoverão um favorável crescimento e uma manutenção saudável dos peixes (El-Haroun et al., 2006). Dentre os tipos de aditivos alimentares que são utilizados destacam-se os promotores de crescimento, os quais proporcionam um melhor desempenho dos peixes (Chakraborty et al., 2014) possibilitando o aumento da produtividade da piscicultura.

Os antibióticos são compostos que quando são fornecidos em dosagens subterapêuticas na forma de aditivo alimentar atuam como promotores de crescimento, pois além da ação contra doenças infecciosas apresentam efeito sobre o desempenho produtivo dos peixes (Reda et al., 2013). A função de promotor de crescimento dos antibióticos está relacionada com o controle que exercem sobre a microflora intestinal e com o afinamento da parede intestinal melhorando a absorção e a utilização de nutrientes (Waibel et al., 1991 e Caston & Leeson, 1992). Embora apresentem melhorias sobre o desempenho produtivo, tais substâncias causam prejuízos a saúde dos peixes pois afetam a produção de anti-corpos e de enzimas antioxidantes e causam alterações nas estruturas hepática e renal (Reda et al., 2013, Pês et al., 2018 e Hoseini & Yousefi, 2019). Além disso, os antibióticos podem deixar resíduos no músculo dos peixes destinados para o consumo e também no meio ambiente, favorecendo a emergência de bactérias patogênicas resistentes (Ljubojević, 2017). Diante desses problemas, a União Europeia desde 2006 e a China desde 2003, baniram a utilização de antibióticos na produção animal visando melhoria na segurança alimentar (Santos & Ramos, 2016). Tais medidas geraram a necessidade de pesquisas sobre produtos que substituam os antibióticos de forma viável.

Como um substituto viável às classes de antibióticos utilizadas como promotores de crescimento destacam-se os óleos essenciais (Ljubojević, 2017). Esses são extratos vegetais que contêm uma mistura concentrada de compostos terpênicos: os terpenoides e seus derivados como os ácidos, álcoois, fenois, cetonas, éteres, aldeídos e ésteres (Sutili et al., 2018). Dentre as plantas que são utilizadas para obtenção de óleos essenciais, a hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) é muito interessante por ser uma planta com produção em escala mundial que apresenta benefícios sobre o trato gastrointestinal, a digestão de nutrientes, o sistema imune e possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas (McKay & Blumberg, 2006). Como principal constituinte do óleo essencial de hortelã-pimenta (OEP) tem-se o monoterpene

mentol, o qual está relacionado com o estímulo do apetite e da digestão (Kamel, 2001) e com a atividade antimicrobiana (İşcan et al., 2002). Tais características tornam o OEP um potencial promotor de crescimento a ser utilizado na alimentação de peixes.

Dentre as principais espécies de peixes produzidas no mundo, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é cultivada em 87 países (FAO, 2020). No Brasil, em 2019 a produção de tilápia representou 57% de toda piscicultura nacional (Peixe BR, 2020). Trata-se de uma espécie capaz de se adaptar ao confinamento (Hayashi et al., 1999 e Angienda et al., 2010), tolerante a bruscas variações de temperatura, alta salinidade, baixo oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia (Gichuru et al., 2019). Em sistemas intensivos tem destaque pela aceitação de alimento artificial, com boa conversão alimentar e rápido crescimento (Furuya, 2010).

Baseado no exposto acima, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos do OEP como promotor de crescimento em tilápia-do-Nilo sobre a atividade das enzimas digestivas, desempenho produtivo, metabolismo energético, enzimas metabólicas e composição da carcaça. Assim, essa dissertação foi organizada em dois capítulos, sendo o primeiro para apresentar a arte da pesquisa, e o segundo com os resultados deste estudo apresentado na forma de manuscrito intitulado como “Óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) como promotor de crescimento em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)” (redigido com base nas normas do periódico *Aquaculture*).

CAPÍTULO 1

ARTE DA PESQUISA

Produção intensiva e os promotores de crescimento na criação de peixes

A aquicultura nos últimos anos vem apresentando rápido crescimento quando comparado com outros setores importantes de produção animal (FAO, 2020). Alguns dos motivos que justificam o rápido crescimento da aquicultura está na intensificação dos sistemas de cultivo e na utilização de dietas formuladas. Entretanto, no cultivo em sistema intensificado os peixes estão sujeitos à exposição de fatores estressantes bem como a alta densidade de estocagem, procedimentos de manejo intensos e maior deterioração da qualidade d'água (Tanjung et al., 2019). Essas condições de estresse afetam os peixes prejudicando o crescimento, a qualidade do filé (Svalheim et al., 2019), o desempenho reprodutivo (Carragher et al, 1989; Lim & Hur, 2018) causando grandes perdas econômicas (Bulfon et al., 2015). Essa realidade em conjunto com a grande demanda do mercado por consumo de proteína animal exige que a aquicultura foque em práticas que possibilitem melhorar o desempenho produtivo aliado ao bem-estar dos peixes durante o cultivo, gerando produtos de qualidade.

Com esse intuito são utilizados os aditivos alimentares (El-Haroun et al., 2006) para favorecer ganho de peso, rendimento e qualidade da carcaça e taxa de sobrevivência dos peixes (Chakraborty et al., 2014). Os aditivos utilizados nas dietas para peixes em cultivo intensivo promovem favorável crescimento e manutenção saudável dos animais durante a criação (El-Haroun et al., 2006). Por definição, os aditivos alimentares são ingredientes incluídos na fórmula da ração que terão efeito sobre as propriedades físico-químicas da dieta (por exemplo os corantes ou gelatinizantes), sobre o desempenho produtivo dos peixes ou na qualidade do produto final (Barrows, 2000). Com relação aos promotores de crescimento, estes são aditivos alimentares utilizados com a proposta de aumentar a eficiência produtiva gerando melhores índices de desempenho ao proporcionarem maior taxa de sobrevivência, ganho de peso, rendimento e qualidade de carcaça (Chakraborty et al., 2014).

Os antibióticos já foram amplamente utilizados em dosagens subterapêuticas como promotores de crescimento na alimentação de peixes, pois além de proporcionarem melhorias no desempenho produtivo, também previnem a ocorrência de doenças causadas por bactérias (Casewell, 1998 e Reda et al., 2013). A utilização de oxitetraciclina e o florfenicol como promotores de crescimento para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), nos níveis de 100 mg kg⁻¹ da dieta e 5 mg kg⁻¹ do peso corporal, respectivamente, apresentaram melhores resultados de ganho de peso e de conversão alimentar, comparado aos peixes que não receberam esses antibióticos na dieta (Reda et al., 2013). As melhorias observadas no crescimento e na eficiência alimentar como resultado da suplementação de antibióticos na alimentação, podem estar

relacionadas com o controle que tais compostos exercem sobre a microflora intestinal. Esses compostos reduzem a população das bactérias intestinais e consequentemente diminuem a produção de subprodutos e toxinas desses microrganismos favorecendo o hospedeiro na competição por nutrientes das dietas, e também estão relacionados com o afinamento da parede intestinal melhorando a absorção e a assimilação de nutrientes (Waibel et al., 1991 e Caston & Leeson, 1992). Embora a oxitetraciclina apresente melhoria no desempenho produtivo, ela causa imunossupressão ao afetar negativamente a produção de anti-corpos e de enzimas do sistema antioxidante, além de alterar a estrutura dos tecidos hepático e renal, deteriorando a saúde dos peixes (Reda et al., 2013, Pês et al., 2018 e Hoseini & Yousefi, 2019).

Entretanto, a maior preocupação em torno da utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção de peixes está nos sérios riscos que oferecem para saúde humana. Os antibióticos deixam traços de resíduos no músculo dos peixes destinados para o consumo, o que pode gerar reações alérgicas em consumidores hipersensíveis a tais substâncias, enquanto que no meio ambiente esses resíduos exercem pressão sobre os microrganismos promovendo a proliferação de populações de bactérias patogênicas resistentes (Ljubojević, 2017), reduzindo assim os efeitos de antibióticos utilizados para tratamento de doenças humanas (Casewell, 1998).

Devido a estes problemas de saúde e ambiental, a União Europeia desde 2006 e a China desde 2003, estabeleceram rigorosas reformas legislativas que baniram a utilização de antibióticos na produção animal visando melhoria na segurança alimentar (Santos & Ramos, 2016). Esta proibição gerou a necessidade de buscar alternativas para utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal, estimulando pesquisas com outras substâncias que também possam apresentar ação de promotor de crescimento para peixes, como por exemplo: os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, extratos vegetais, dentre outros.

Os probióticos são microrganismos vivos ou não, que podem ser utilizados como suplementos alimentares sob a forma de uma cepa isolada ou múltipla, administrada para melhorar as respostas fisiológicas e imunológicas dos animais aquáticos, os principais modos de ação são: a exclusão de bactérias indesejáveis por competição e a imunomodulação (Dawood et al., 2018). Tilápias (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) apresentaram melhor crescimento e aproveitamento da dieta, benefícios na saúde e na microflora intestinal, maiores vilosidades na parede intestinal e redução da população de *Escherichia coli*, além de maior resistência contra infecção por *Aeromonas hydrophila*, quando alimentadas com dietas suplementadas contendo *Clostridium butyricum* nos níveis de 1 a 2 g kg⁻¹ da dieta (Poolsawat et al., 2019). Outro estudo utilizando probiótico contendo múltiplas cepas, composto por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

cereus e *Bacillus subtilis* e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardi*, na suplementação das dietas de tilápias-do-Nilo cultivadas em água de esgoto doméstico tratado, constatou que houve melhorias no consumo de ração, na taxa de crescimento específico, e na composição química da carcaça, com a redução do teor de extrato etéreo e o aumento no teor de proteína bruta (Ferreira et al., 2018).

Os prebióticos são compostos fibrosos não digestíveis pelo animal, que são utilizados como fonte energética por bactérias benéficas do trato gastrointestinal, regulando a atividade imunomodulatória deste modo ou de forma direta sobre o sistema imune inato; também apresentam benefícios sobre o desempenho produtivo, microflora intestinal e resistência dos peixes (Dawood et al., 2018). Em estudo com quatro prebióticos: frutoligossacarídeos (FOS) na forma de inulina, galactoligossacarídeos (GOS), mananoligossacarídeos (MOS) derivado de levedura (Bio-MOS[®]) e um extrato de hemicelulose contendo galacto-gluco-manans (Previda[™]), suplementando 10 g kg⁻¹ em dietas para *Sciaenops ocellatus*, os autores observaram a inclusão desses prébióticos refletiram em melhoria no desempenho produtivo, morfologia intestinal e respostas imunológicas quando comparado ao controle, com destaque para o Previda[™] que apresentou os melhores resultados dentre os outros prebióticos (Zhou et al., 2010). Utilizado FOS na alimentação de *Rutilus rutilus*, houve melhor resposta do sistema imune inato, atividade de enzimas digestivas (protease, lipase e amilase), crescimento e resistência ao estresse por salinização da água destes peixes (Soleimani et al., 2012).

Os ácidos orgânicos são ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos voláteis ou ácidos carboxílicos fracos que possuem propriedades antimicrobianas e melhoram o crescimento, a utilização de nutrientes das dietas e a resistência dos animais aquáticos, podendo ser utilizados também na forma de sais ácidos (Dawood et al., 2018). O efeito que eles exercem sobre bactérias do trato gastrointestinal pode ser de forma indireta ou direta. O efeito indireto ocorre pela redução do pH da porção inicial do trato gastrointestinal favorecendo as bactérias benéficas, enquanto que o efeito direto ocorre pela ação dos ácidos orgânicos (fórmico, propiônico e sórbico) sobre a membrana celular de algumas bactérias, por alterações no complexo enzimático intracelular e interferência na duplicação do DNA (Van den Broek, 2000). O modo de ação dos ácidos orgânicos sobre a inibição do crescimento de bactérias gram-negativas está em sua capacidade de penetrar em seu interior através da parede celular e liberar prótons (H⁺) em seu citoplasma (Bai et al., 2015), desregulando o pH intracelular. Deste modo, para manter o equilíbrio homeostático do pH intracelular as bactérias consomem energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) excretando o H⁺, o que pode levar a morte celular através do esgotamento de suas reservas energéticas (Defoirdt et al., 2009). Dietas para *Sciaenops*

ocellatus suplementadas com lactato de cálcio, diformato de potássio ou com ácido cítrico à 15 g kg⁻¹ da dieta melhoram o desempenho produtivo com relação ao controle, entretanto destacaram-se os animais que receberam ácido cítrico por apresentarem maior ganho de peso (Castillo et al., 2014). De acordo com os mesmos autores, esse resultado ocorreu por meio da ação positiva sobre a atividade de enzimas digestivas pepsina, enzimas pancreáticas e intestinais, que foram maiores com a inclusão desses ácidos orgânicos na dieta.

Extratos vegetais, também denominados como fitoterápicos, são compostos concentrados obtidos a partir da planta inteira ou mesmo de suas partes como folhas, raízes, sementes ou frutos. Os métodos de extração variam entre procedimentos que utilizam solventes aquosos e orgânicos (etanol, metanol, metil acetato, hexano, butano, acetona, etc.) ou são preparados como óleos essenciais (Bulfon et al., 2015). As plantas são fontes ricas em compostos bioativos como óleos voláteis, saponinas, ácidos orgânicos, fenólicos, taninos, alcaloides, polissacarídeos e polipeptídeos (Abasali & Mohamad, 2010), os quais desempenham ação sobre a fisiologia e o metabolismo dos peixes. Os princípios ativos dos extratos vegetais (ou a combinação dos mesmos), os conferem propriedades antimicrobianas, imunoestimulantes, antiestresse e de promotores de crescimento (Citarasu, 2010). Geralmente as plantas utilizadas na forma de extrato vegetal são de fácil acesso e possuem baixo custo, o que possibilita a sua utilização em larga escala na aquicultura, para providenciar melhor crescimento e ao mesmo tempo proteção aos peixes (Awad & Awaad, 2017).

A Tabela 1 apresenta alguns vegetais comumente utilizados como extratos vegetais evidenciando o principal constituinte e as propriedades conhecidas dos mesmos nos seres vivos. Na tabela, existem espécies vegetais que compartilham do mesmo princípio ativo, mas que apresentam diferentes propriedades para o ser vivo. Isso indica que há uma interação sinérgica dos constituintes do extrato vegetal a qual modula o seu modo de ação (Kamel, 2001), não sendo as propriedades determinadas apenas pelo princípio ativo que se encontra em maior quantidade. Devido à grande diversidade de moléculas presentes no extrato vegetal e por essas serem mais biodegradáveis comparado aos compostos sintéticos, a sua utilização pode reduzir os custos de tratamento de doenças além de ser ecologicamente correto, reduzindo o surgimento de patógenos resistentes no meio ambiente (Olusola et al., 2013). Extratos de *Ocimum sanctum* e *Whitania somnifera* na alimentação de *Epinephelus tauvina* infectados com *Vibrio harvery*, melhoraram os parâmetros imunes e também apresentaram bons resultados de desempenho produtivo (Sivaram et al., 2004). O extrato de *Allium satium* melhorou a utilização da dieta e o crescimento de *Acipenser ruthenus* (Lee et al., 2012), e em tilápia-do-Nilo melhorou o crescimento, a saúde e as bactérias totais e coliformes na água, no músculo e no intestino

(Shalaby et al., 2006). Utilizado como aditivo alimentar em dietas de *Astianax aff. bimaculatus*, *Curcuma longa* em pó apresentou melhorias na morfologia intestinal dos animais e também estimulou a síntese de glicogênio hepático desses peixes (Ferreira et al., 2017). Entretanto, as propriedades benéficas dos extratos vegetais sobre a saúde e o crescimento dos peixes irão depender da parte da planta utilizada, do método de extração adotado e da sua concentração fornecida nas dietas (Reverter et al., 2014).

Tabela 1. Vegetais utilizados para obtenção de extrato vegetal, partes da planta utilizadas para extração, principais constituintes e suas propriedades nos seres vivos.

Vegetal	Nome científico	Parte utilizada	Principal constituinte	Propriedades
Noz-moscada	<i>Myristica bichuhyba</i>	Semente	Sabineno	Estimulante da digestão e antidiarreico
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Casca	Cinamaldeído	Estimulante do apetite e da digestão e antisséptico
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Semente	Eugenol	Estimulante do apetite e da digestão e antisséptico
Cardamomo	<i>Elettaria cardamomum</i>	Semente	Cineol	Estimulante do apetite e da digestão
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Semente e folhas	Linalol	Estimulante da digestão
Cominho	<i>Cuminum cyminum</i>	Semente	Cuminaldeído	Digestivo e carminativo
Anis-estrelado	<i>Illicium verum</i>	Fruto	Anetol	Estimulante da digestão
Salsão	<i>Apium graveolens</i>	Fruto e folhas	Ftaletol	Estimulante do apetite e da digestão
Salsinha	<i>Petroselinum crispum</i>	Folha	Apiol	Estimulante do apetite e da digestão e antisséptico
Pimenta-malagueta	<i>Capsicum frutescens</i>	Fruto	Capsaicina	Antidiarreico, anti-inflamatório e estimulante tônico
Pimentão	<i>Capsicum annuum</i>	Fruto	Piperina	Estimulante da digestão
Mostarda	<i>Brassica alba</i>	Semente	Isotiocianato de alila	Estimulante da digestão
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Raiz	Zingerona	Estimulante gástrico
Alho	<i>Allium sativum</i>	Bulbo	Alicina	Estimulante da digestão e antisséptico
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Folha	Carvacrol	Estimulante do apetite e da digestão, antimicrobiano, anticarcinogênico e anti-inflamatório
Açafrão	<i>Crocus sativus</i>	Flor	Safranal	Estimulante do apetite e da digestão
Açafrão-da-terra	<i>Curcuma longa</i>	Raíz	Carvona e cineol	Estimulante da digestão, antidiarreico, antimicrobiano e antioxidante
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folha	Cineol	Estimulante da digestão, antisséptico e antioxidante
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Planta inteira	Timol	Estimulante da digestão, antisséptico e antioxidante

Sálvia-comum	<i>Salvia officinalis</i>	Folha	Cineol	Estimulante da digestão, antisséptico e carminativo
Loureiro	<i>Laurus nobilis</i>	Folha	Cineol	Estimulante do apetite e da digestão e antisséptico
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Folha	Mentol	Estimulante do apetite e da digestão e antisséptico

(Adaptado de Kamel, 2001).

Óleos essenciais e a hortelã-pimenta na produção de peixes

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos e voláteis que contêm misturas orgânicas de extratos vegetais (Kačániová et al., 2017) ricamente concentrados em metabólitos secundários de plantas aromáticas (Chakraborty et al., 2014), os quais são os seus princípios ativos. Os metabólitos secundários que compõem os óleos essenciais, em sua maioria, consistem de substâncias terpenoides e seus derivados (ácidos, álcoois, fenóis, cetonas, éteres, aldeídos e ésteres), que são seguros ao consumidor e ao meio ambiente por tratarem-se de produtos naturais (Suttili et al., 2018).

Entretanto, a composição química dos óleos essenciais bem como a sua qualidade é determinada por vários fatores, dentre eles, o método de extração utilizado que pode ser por destilação, prensagem a frio, extração por fluido supercrítico, extração por solventes, dentre outros (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). O método por destilação a vapor (Figura 1) é o mais utilizado, e consiste basicamente da ebulição da água por meio de uma fonte de calor, gerando vapor que irá aquecer a matéria vegetal e extrair o óleo. O calor aplicado deve possuir temperatura suficiente para a ruptura da estrutura celular da matéria vegetal, que como consequência irá liberar os compostos aromáticos (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Em seguida, o vapor contendo o óleo essencial é condensado e separado da fração aquosa (hidrossóis).

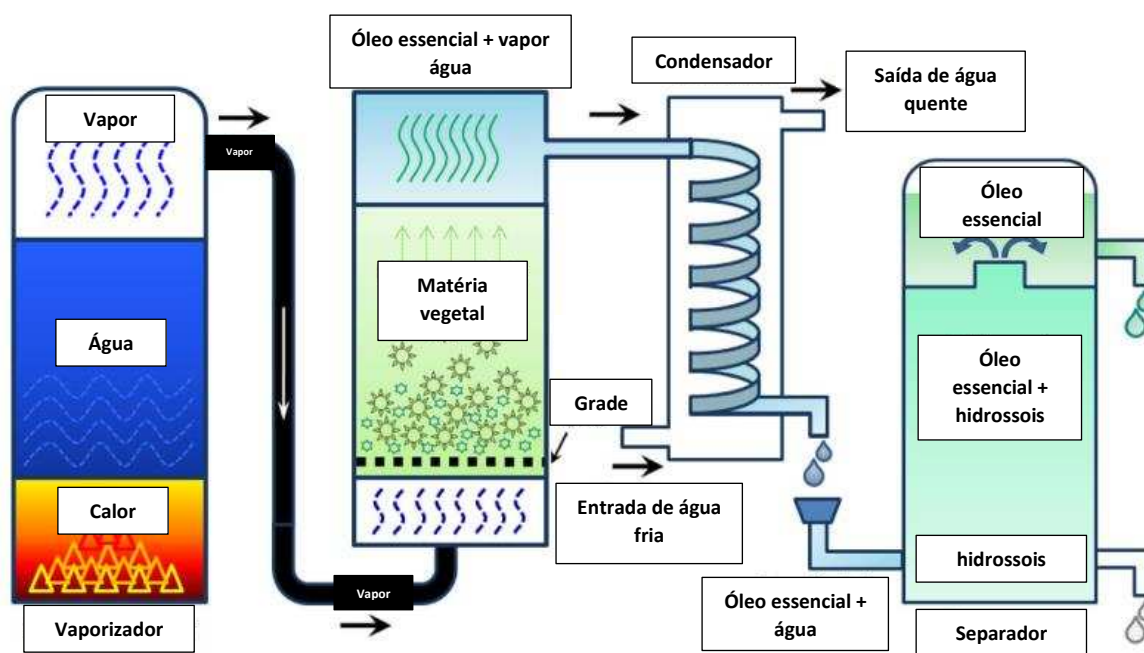


Figura 1. Diagrama ilustrando o método por destilação a vapor. (Adaptado de: Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Além do método de extração, outros fatores que influenciam a qualidade dos óleos essenciais, bem como a quantidade de seus princípios ativos, são: o estágio de desenvolvimento da planta, o ciclo ativo de polinização, a parte utilizada da planta, sazonalidade, o método de cultivo, variação geográfica, o material genético e o armazenamento (Figueiredo et al., 2008). Diante disso, é importante que o óleo essencial sempre que possível seja obtido de plantas que compartilhem do mesmo material genético (De Freitas Souza et al., 2019a) e que sejam cultivadas sob as mesmas condições sazonais e geográficas, para garantir a consistência da sua composição química.

Nas plantas os compostos metabólitos secundários tem o papel de desempenhar funções de defesa, como por exemplo contra animais herbívoros ou patógenos, de comunicação com outras plantas e de atração com agentes polinizadores (Figueiredo et al., 2008). Com relação aos óleos essenciais, esses compostos apresentam propriedades anestésicas (Becker et al., 2012, Parodi et al., 2014 e Sena et al., 2016), antimicrobianas (Acar et al., 2015, Baba et al., 2016 e Malheiros et al., 2016) e antioxidantes (Saccol et al., 2013, Zeppenfeld et al., 2017 e Lopes et al., 2019), as quais melhoram a saúde, o crescimento e o bem-estar dos animais. As formas de utilização variam como banhos preventivos, anestésicos, sedativos, estabilizantes das dietas ou promotores de crescimento (Sutili et al., 2018 e De Freitas Souza et al., 2019a). Algumas das vantagens na utilização dos óleos essenciais na alimentação de peixes estão nas suas características naturais, biodegradáveis e na sua capacidade de cumprir função semelhante à alguns compostos sintéticos (Figueiredo et al., 2008), como por exemplo algumas classes de antibióticos que podem ser utilizados como promotores de crescimento (Ljubojević, 2017).

A ação como promotores de crescimento dos óleos essenciais está relacionada principalmente com a influência que exercem sobre o trato gastrointestinal do animal. Seus princípios ativos aumentam a produção de enzimas digestivas o que melhora a digestibilidade e a disponibilidade dos nutrientes da dieta (Adel et al., 2015b e De Souza et al., 2019). Desse modo, há menor quantidade de material indigestível passando pelo trato intestinal limitando a quantidade de substrato para bactérias patogênicas, reduzindo a sua proliferação (Citarasu et al., 2010), por fim favorecendo de forma indireta as bactérias benéficas.

Portanto, a ação positiva dos óleos essenciais no crescimento dos peixes está na sua forma de ação quando comparados com os antibióticos, que por sua vez atuam diretamente sobre as bactérias do trato gastrointestinal (Waibel et al., 1991 e Caston & Leeson, 1992). Porém, além da ação indireta dos compostos dos óleos essenciais sobre as bactérias intestinais, alguns princípios ativos também apresentam ação direta como bactericidas, principalmente sobre bactérias patogênicas ao suprimirem os seus fatores de resistência celular (Citarasu et al., 2010,

Kačániová et al., 2017 e Sutili et al., 2018). O modo de ação sobre as bactérias patogênicas é por meio da desestruturação da parede celular, bloqueio da síntese de proteínas e de DNA, inibição da secreção de enzimas e interferência sobre os mecanismos de sinalização celular (Citarasu et al., 2010). Desta maneira os óleos essenciais beneficiam o peixe por meio do controle da sua flora intestinal, pois assim, ao reduzirem a população de bactérias patogênicas no trato digestivo diminuem a competição por nutrientes o que favorece a proliferação de bactérias benéficas.

Além da atuação dos óleos essenciais sobre a digestibilidade dos nutrientes e o controle da flora intestinal, eles também possuem ação sobre a morfologia intestinal influenciando positivamente as secreções da mucosa e melhorando as propriedades físicas e químicas do intestino (Zeppenfeld et al., 2016, Valladão et al., 2017 e Heluy et al., 2020). Entretanto, como alguns princípios ativos possuem um sítio específico de ação a sua eficácia pode ser limitada devido a degradação e absorção dos mesmos, a qual podem ocorrer em diferentes partes do trato gastrintestinal, havendo portanto, a possibilidade de serem metabolizados antes de atingirem tal sítio específico (Sutili et al., 2018). Sendo assim, em alguns casos utilizam-se os óleos essenciais na forma micro encapsulada para evitar a degradação dos compostos do óleo antes de atingirem o seu sítio específico de ação (De Freitas Souza et al., 2018).

A utilização dos óleos essenciais como aditivos nas dietas para peixes tem demonstrado efeitos positivos sobre o desempenho produtivo, na eficiência de utilização dos nutrientes, na resistência a microrganismos patogênicos e na tolerância ao estresse para algumas espécies de peixes (Tabela 2).

Tabela 2. Ação dos óleos essenciais como aditivo em dietas para peixes.

Espécie vegetal	Espécie do peixe	Efeitos	Referências
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Melhorias no desempenho produtivo; Melhorias na atividade antioxidante e na resposta ao estresse.	Zeppenfeld et al., 2016; Zeppenfeld et al., 2017
<i>Citrus x aurantium</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Melhorias no desempenho produtivo, bioquímica sérica e atividade antioxidante.	Lopes et al., 2019
<i>Citrus cinensis</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Melhorias no desempenho produtivo, na imunidade e na resistência à infecção por <i>Streptococcus iniae</i> .	Acar et al., 2015
<i>Citrus limon</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Melhorias no desempenho produtivo, resposta imune, parâmetros hematológicos, bioquímica sérica e a resistência à <i>Edwardsiella tarda</i> .	Baba et al., 2016
<i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Perlagonium graveolens</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Melhorias no desempenho produtivo, resposta imune, atividade antioxidante e resistência à <i>Aeromonas hydrophila</i> .	Al-Sagheer et al., 2018
<i>Lippia alba</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Melhoria na atividade antioxidante e aumento nas reservas de glicogênio hepático e muscular.	Saccol et al., 2013
<i>Lippia alba</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Melhorias na conversão alimentar, sistema imune e a resistência à <i>Aeromonas</i> spp.	De Souza et al., 2019
<i>Malaleuca alternifolia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Melhorias na atividade antioxidante e efeito protetivo contra toxidez por aflotoxina na dieta.	De Freitas Souza et al., 2019b
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Melhorias no desempenho produtivo, enzimas intestinais, lisozima e variáveis hematológicas.	De Souza et al., 2019
<i>Origanum heracleoticum</i> L.	<i>Ictalurus punctatus</i>	Melhorias no desempenho produtivo, atividade antioxidante, deposição muscular, e resistência a infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i> .	Zheng et al., 2009
<i>Origanum onites</i> L.	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Melhorias no desempenho produtivo e resistência à infecção por <i>Lactococcus garviae</i> .	Diler et al., 2017
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Astianax altiparanae</i>	Melhorias no desempenho produtivo e composição da carcaça.	Ferreira et al., 2014

Dentre as plantas utilizadas como fonte de óleo essencial, a hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) se destaca por ser uma planta de produção em escala mundial que possui como benefícios as propriedades antioxidantes, antimicrobianas, de ação no sistema imune e no trato digestivo (McKay & Blumberg, 2006). A hortelã-pimenta advém do cruzamento entre as espécies *M. aquatica* e *M. spicata* e é pertencente à família Lamiaceae (Ministério da Saúde, 2015). Seu óleo essencial é amplamente utilizado em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (Singh et al., 2015), e possui como principais constituintes (Figura 2 e tabela 3) os monoterpenos: mentol, mentona e o acetato de mentila.

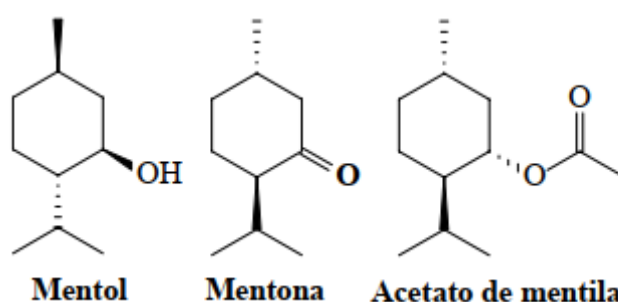


Figura 2. Estrutura dos monoterpenos do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) (Fonte: Freire, 2006).

Tabela 3. Principais constituintes do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*).

Constituintes do óleo essencial de hortelã-pimenta	Referências				
	Mimica-Dukič et al., 2003.	Yang et al., 2010.	Freire et al., 2012.	Ribeiro et al., 2018.	De Souza Silva et al., 2019.
Mentol (%)	39,63	33,37	54,20	30,80	33,80
Mentona (%)	8,93	21,41	7,30	18,20	15,20
Acetato de mentila (%)	10,44	6,71	4,0	9,7	13,00

O mentol e a mentona são os constituintes mais voláteis presentes no óleo essencial de hortelã-pimenta (McKay & Blumberg, 2006), estando o mentol relacionado com propriedades antissépticas, estimulatória do apetite e da digestão (Kamel, 2001) e atividade antimicrobiana (İşcan et al., 2002). Estudos *in vitro* avaliando a capacidade antioxidante do óleo essencial de hortelã-pimenta, sugerem que sua propriedade em eliminar as espécies reativas de oxigênio (radicais livres) está relacionada com os compostos mentona, isomentona (Mimica-Dukič et al., 2003), mentol, α -terpineno e 1,8-cineol (Riachi & Maria, 2015). Em busca de manter a homeostase, os peixes eliminam os radicais livres para neutralizar o estresse oxidativo e prevenir ou reparar os danos causados pela oxidação dos tecidos (Saccol et al., 2013 e Paital, 2014). Para isso, as enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione

peroxidase e glutathione-S-transferase agem sobre os radicais livres evitando a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, o que previne que os danos oxidativos prejudique as funções celulares e a apoptose celular (De Freitas Souza et al., 2019b).

A suplementação com mentol ($2,5 \text{ g kg}^{-1}$) durante 30 dias na alimentação de *Cyprinus carpio* expostas à $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de amônia não-ionizada por 24 horas, melhorou a resposta dos peixes ao estresse, mitigando os danos nos tecidos pelo aumento da atividade da glutathione peroxidase, reduzindo o malondialdeído (produto da peroxidação lipídica) e prevenindo a redução da catalase pelo estresse (Hoseini et al., 2019). Na utilização de óleo essencial de *Mentha spicata* na alimentação de *Oncorhynchus mykiss* por 60 dias, foi observado no tecido hepático dos peixes uma maior atividade das enzimas superóxido dismutase, glucose-6-fosfato desidrogenase e glutathione peroxidase comparado aos peixes alimentados com dieta controle (Sönmez et al., 2014). Utilizando o óleo essencial de hortelã-pimenta na alimentação de *Colossoma macropomum* por 30 dias, houve maior atividade da enzima catalase no fígado dos peixes suplementado com 10 g kg^{-1} do óleo e a peroxidação lipídica foi menor em peixes suplementados com 5 g kg^{-1} do óleo, nos rins a atividade da glutathione peroxidase foi maior na concentração de 15 g kg^{-1} e a peroxidação lipídica foi menor com 5 g kg^{-1} do óleo (Ribeiro et al.; 2018).

Como aditivo alimentar, a hortelã-pimenta também demonstrou benefícios no desempenho produtivo, no sistema imune-humoral, nos parâmetros hematológicos e na resistência à infecção por patógenos quando fornecida na dieta de diversas espécies de peixes. O extrato obtido das partes aéreas da hortelã-pimenta (solvente 80 % etanol) em dietas para *Rutilus frisii kutum* apresentou os melhores resultados à nível de 30 g kg^{-1} no desempenho produtivo, na composição do muco que recobre o corpo do peixe melhorando sua integridade e resistência à *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, nos parâmetros imunológicos e nos parâmetros hematológicos (Adel et al., 2015a). Em *O. mykiss*, o extrato de hortelã-pimenta obtido de forma semelhante, melhorou os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos peixes bem como sua defesa imunológica, conferindo aos peixes maior resistência à infecção por *Yersinia ruckeri* (Adel et al., 2016). Em outro estudo o extrato de *M. piperita* também obtido da mesma forma suplementando dietas para *Salmo trutta caspius*, também apresentou melhora no desempenho produtivo, na composição do muco que recobre o corpo do peixe, nos parâmetros imunes e hematológicos, aumentou a atividade da enzima amilase, responsável pela digestão do amido, e teve efeito positivo sobre a microflora intestinal, aumentando a população de bactérias ácido lácticas (Adel et al., 2015b). As bactérias ácido lácticas são um grupo de bactérias anaeróbicas que produzem ácido lático, e são utilizadas

como probióticos na aquicultura pois apresentam melhorias nos parâmetros imunes, enzimas digestivas e modulam a microbiota intestinal (Valipour et al., 2019).

O óleo essencial de hortelã-pimenta na alimentação de *O. niloticus* administrado durante 60 dias, apresentou efeito sobre o sistema imune inato dos peixes ao ativar o sistema complemento (ACH50) (Valladão et al., 2017). Os autores concluíram que o óleo essencial de hortelã-pimenta possui potencial para utilização como aditivo na alimentação de peixes, pois apresentou efeitos benéficos sobre a saúde intestinal e os parâmetros imunes dos peixes, mesmo sendo fornecidos em pequenas doses de suplementação (100 e 250 mg kg⁻¹), o que permite que sua inclusão nas dietas tenha baixo custo (Valladão et al., 2017). A hortelã-pimenta tem efeito principalmente sobre o trato gastrintestinal dos peixes melhorando as funções intestinais, a capacidade de absorção de nutrientes, estimulando a atividade de enzimas digestivas, beneficiando a microflora intestinal ao favorecer a população das bactérias comensais devido sua ação contra bactérias patogênicas e promovendo a saúde e a integridade do muco e do epitélio intestinal (Adel et al., 2015b e Valladão et al., 2017). Com relação a utilização de óleo essencial de hortelã-pimenta como suplemento alimentar em *Colossoma macropomum* durante 30 dias, que em seguida foram desafiados com *Aeromonas hydrophila*, a inclusão na dieta de 5 e 15 g kg⁻¹ apresentou efeitos positivos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos peixes como o aumento das hemoglobinas e da proteínas plasmáticas (Ribeiro et al., 2016). Em *Oreochromis niloticus* desafiadas por *Streptococcus agalactiae*, os peixes que receberam 2,5 g kg⁻¹ de óleo essencial de hortelã-pimenta na dieta durante 50 dias apresentaram maior resistência à bactéria e maior concentração de proteína plasmática, leucócitos e trombócitos (De Souza Silva et al., 2019).

Diante das informações descritas, fica evidente que o óleo essencial de hortelã-pimenta possui potencial para ser utilizado como promotor de crescimento devido aos benefícios no desempenho produtivo, saúde e bem-estar dos peixes e por ser um produto de grande oferta no mercado. Portanto, essa pesquisa foi desenvolvida a fim de avaliar o efeito do óleo essencial de hortelã-pimenta como aditivo em dietas para peixes sobre as variáveis de desempenho produtivo, enzimáticas e metabólicas.

Produção de tilápia-do-Nilo

A produção mundial de peixes atingiu 171 milhões de toneladas em 2016, sendo a produção de peixes em cativeiro a principal atividade responsável pelo aumento do abastecimento desses animais para o consumo (FAO, 2020). Além disso, a aquicultura vem apresentando ao longo dos anos crescimento na produção, enquanto que os produtos provenientes da pesca apresentam uma produção estática desde o início de 1990 (FAO, 2020). O crescimento anual da aquicultura estava em 5,8 % durante o período de 2001 a 2016, e o continente Americano em 2016 através desse setor contribuiu com 18 % da produção mundial de peixes (FAO,2020). Dentre os principais peixes produzidos a tilápia-do-Nilo tem seu cultivo distribuído em 87 países, sendo que em 2016 foram produzidos 4.200 milhões de toneladas, caracterizando-a como uma das espécies mais produzida no mundo (FAO, 2020).

No Brasil em 2019 a produção de tilápia foi de 432.149 toneladas com representatividade de 57% da piscicultura brasileira, e a projeção para 2020 é de uma produção de 460 mil toneladas, deixando o país apenas atrás da China, Indonésia e do Egito (Peixe BR, 2020). Os estados brasileiros com maior produção de tilápia são o Paraná (33,83 %), São Paulo (15,02 %), Santa Catarina (8,92 %), Minas Gerais (8,41 %) e Pernambuco (5,84 %) (Peixe BR, 2020). Com relação à exportação, em 2018 o pescado brasileiro gerou US\$ 275 milhões e a piscicultura brasileira apresentou um crescimento de 833 % entre os anos de 2015 (701 t) a 2019 (6.543 t) com a tilápia-do-Nilo representando 81 % do volume exportado no último ano (Peixe BR, 2020).

A tilápia-do-Nilo pertence à família Cichlidae e teve sua origem na bacia do rio Nilo, no leste africano, foi introduzida no Brasil com a linhagem Bouaké em 1971, sendo difundida a partir de então para todo o país (Borges et al., 2005 e Da Silva, et al. 2015). Em 1996 foram importadas da Tailândia tilápias da linhagem Chitralada e em 2005 foram introduzidas tilápias da linhagem GIFT (Genetic Improved Farmed Tilapia), a qual foi selecionada geneticamente para apresentar um bom desempenho produtivo em várias condições ambientais (Dan & Little, 2000). Atualmente as duas últimas estão entre as linhagens mais conhecidas na produção nacional (Igarashi, 2018).

A produção de tilápia-do-Nilo é viável pois se trata de uma espécie tolerante às variações bruscas de temperatura, alta salinidade, baixo oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia (Gichuru et al., 2019). Comercialmente a tilápia é utilizada para atividade esportiva, consumo humano e processamento na indústria, e apresenta aproveitamento total do peixe desde o filé, que possui boas características organolépticas, até os subprodutos para fabricação

de farinha de peixe e o couro para fabricação de acessórios (Souza & Maranhão, 2001; Figueiredo & Valente Junior, 2008 e Furuya, 2010).

É um peixe que se adapta ao confinamento (Hayashi et al., 1999 e Angienda et al., 2010), com a criação no Brasil variando principalmente entre viveiros ou tanques-rede (Furuya, 2010) e que é capaz de se reproduzir naturalmente mesmo em tais condições (Biswas et al., 2005 e Angienda et al., 2010). Trata-se de uma espécie muito prolífera que atinge a maturação sexual precocemente, em geral de 4 a 5 meses de idade dependendo das condições ambientais (Angienda et al., 2010). Contudo, a reprodução indesejada no sistema de criação pode levar à superpopulação dos tanques, gerando competição por alimento e um crescimento insatisfatório (Lèveque, 2002). Diante disso é adotado o cultivo monosssexual masculino, pois além de evitar a reprodução indesejada, também otimiza a produtividade (Kwon et al., 2000 e Borges et al., 2005). Os machos são escolhidos por apresentarem um crescimento mais rápido com relação às fêmeas (Mair & Little, 1991, Dan & Little, 2000 e Beardmore et al., 2001), o que reduz o ciclo de produção.

A tilápia-do-Nilo tem destaque em sistemas intensivos pela aceitação de alimentos artificiais em todas as fases de cultivo, pela boa conversão alimentar e pelo rápido crescimento (Furuya, 2010). O ciclo produtivo da criação de tilápias em sistemas intensivos pode atingir 6 meses de cultivo (Sabbag et al., 2007). Entretanto, na criação em sistemas intensificados os peixes estão mais sujeitos ao estresse, o que aumenta sua susceptibilidade de contrair doenças infecciosas e gerar prejuízos econômicos à produção (Bulfon et al., 2015). Isso ocorre principalmente nas fases iniciais de vida onde os peixes praticamente apresentam somente o sistema imune inato para sua defesa, pois são ainda muito jovens e o seu sistema imune adaptativo (ou sistema imune-humoral) não foi desenvolvido, assim não apresentam memória imunológica para desencadear uma resposta às doenças infecciosas (Da Silva et al., 2015). Uma das formas de mitigar os efeitos do estresse e também melhorar o sistema imune-humoral dos peixes é por meio da utilização de aditivos nas dietas, os quais favorecem o crescimento e a manutenção saudável durante a criação (El-Haroun et al., 2006), como por exemplo a utilização de promotores de crescimento.

Como a tilápia-do-Nilo é um peixe amplamente cultivado em todas as fases de criação em sistemas intensificados, torna-se interessante a utilização de promotores de crescimento para reduzir o seu ciclo de produção e também aliviar o estresse dos peixes, gerando um produto final de qualidade ao consumidor.

REFERÊNCIAS

- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282-286.
- Adel, M., Amiri, A. A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., & Esteban, M. Á. (2015a). Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 841-847.
- Adel, M., Safari, R., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Esteban, M. Á. (2015b). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at mucosal and systemic level) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish & shellfish immunology*, 47(1), 623-629.
- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Ghiasi, M. (2016). Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish & shellfish immunology*, 55, 267-273.
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2018). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1006-1014.
- Angienda, P. O., Aketch, B. O., & Waindi, E. N. (2010). Development of all-male fingerlings by heat treatment and the genetic mechanism of heat induced sex determination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6(1), 38-43.
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & shellfish immunology*, 67, 40-54.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., & Yılmaz, S. (2016). Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 465, 13-18.
- Bai, S. C., Katya, K., & Yun, H. (2015). Additives in aquafeed: an overview. *Feed and feeding practices in aquaculture*, Woodhead Publishing, 171-202.
- Barrows, F. T. (2000). Feed additives. *Encyclopedia of Aquaculture*, R. R. Stickney, ed. Hoboken, NJ: John Wiley and sons, 335-340.
- Beardmore, J. A., Mair, G. C., & Lewis, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. In *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture*, Elsevier, 283-301.

- Becker, A. G., Parodi, T. V., Heldwein, C. G., Zeppenfeld, C. C., Heinzmann, B. M., & Baldissierotto, B. (2012). Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 789-796.
- Biswas, A. K., Morita, T., Yoshizaki, G., Maita, M., & Takeuchi, T. (2005). Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, 243(1-4), 229-239.
- Borges, A. M., Moretti, J. O. C., McManus, C., & Mariante, A. D. S. (2005). Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(2), 153-159.
- Boscolo, W. R., Hayashi, C., Meurer, F., Feiden, A., & Bombardelli, R. A. (2004). Apparent digestibility of energy and protein of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and corvina (*Plagioscion squamosissimus*) by-product meal, and canela crayfish (*Macrobrachium amazonicum*) meal for Nile. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(1), 8-13.
- Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2015). Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 46(3), 513-551.
- Carragher, J. F., Sumpter, J. P., Pottinger, T. G., & Pickering, A. D. (1989). The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *General and comparative endocrinology*, 76(2), 310-321.
- Carvalho, A. H. F., Lopes, J. B., Bona, M. D. N. A. A., Baratta, C. A. M., & Andrade, F. T. (2018). Probiotic addition effect assessment in the diet of fingerling and juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) created in treated sewage. *Engenharia sanitária e ambiental*, 23(4), 665-674.
- Casewell, M. (1998). Antimicrobial Resistance in Humans and Animal Feed Additives in Perspective. *FEDESA/FEFANA*, 6-8.
- Castillo, S., Rosales, M., Pohlenz, C., & Gatlin III, D. M. (2014). Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 433, 6-12.
- Caston, L. J., & Leeson, S. (1992). The response of broiler turkeys to flavomycin. *Canadian Journal of Animal Science*, 72(2), 445-448.
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1-19.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.
- Da Silva, G. F., Maciel, L. M., Dalmass, M. V., Gonçalves, M. T. (2015). Tilápia-do-Nilo: criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná. *Curitiba: GIA*, 290.

Dan, N. C., & Little, D. C. (2000). The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. *Aquaculture*, 184(3-4), 221-231.

Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.

De Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., & Mancera, J. M. (2019a). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. *Frontiers in physiology*, 10, 785.

De Freitas Souza, C., Baldissera, M. D., Descovi, S., Zeppenfeld, C., Eslava-Mocha, P. R., Gloria, E. M., Zanette, R. A., Baldisserotto, B. & Silva, A. S. D. (2019b). *Melaleuca alternifolia* essential oil abrogates hepatic oxidative damage in silver catfish (*Rhamdia quelen*) fed with an aflatoxin-contaminated diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 221, 10-20.

De Freitas Souza, C., Rampelotto, C., Loureiro, B. B., Pereira, F. A., Bianchini, A. E., Corcini, C. D., Varela Junior, A. S., Emanuelli, T. M. Da Silva, L. P., Da Costa, S. T., Brtolin, K., Rovani, M. T., Gonçalves, P. B. D., Heinzmann, B. M. & Baldisserotto, B. (2018). Effects of dietary microencapsulated *Cymbopogon flexuosus* essential oil on reproductive-related parameters in male *Rhamdia quelen*. *Fish physiology and biochemistry*, 44(4), 1253-1264.

De Souza, R. C., de Souza, E. M., da Costa, M. M., Melo, J. F. B., Baldisserotto, B., & Copatti, C. E. (2019). Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. *Aquaculture nutrition*, 25(1), 39-45.

De Souza, E. M., de Souza, R. C., Melo, J. F., da Costa, M. M., de Souza, A. M., & Copatti, C. E. (2019). Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture*, 504, 7-12.

De Souza Silva, L. T., de Pádua Pereira, U., de Oliveira, H. M., Brasil, E. M., Pereira, S. A., Chagas, E. C., Jesus, G. F. A., Cardoso, L. Mouriño, J. L. P. & Martins, M. L. (2019). Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 506, 205-211.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances*, 27(6), 680-685.

Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. E. Ç. İ. L. (2017). 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.

Dror, M., Sinyakov, M. S., Okun, E., Dym, M., Sredni, B., & Avtalion, R. R. (2006). Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109(3-4), 279-287.

El-Haroun, E. R., Goda, A. S., & Kabir Chowdhury, M. A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen[®] supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473-1480.

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

Ferreira, P. D. M. F., da Silva Nascimento, L., Dias, D. C., da Veiga Moreira, D. M., Salaro, A. L., de 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*, 1(45), 28-34.

Ferreira, A. H. C., Lopes, J. B., Araripe, M. D. N. B. A., Monteiro, C. A. B., & Andrade, F. T. (2018). Avaliação do efeito da adição de probiótico na dieta de alevinos e juvenis de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) criados em esgoto doméstico tratado. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 23(4), 665-674.

Ferreira, P. D. M. F., Martins, M. T. S., Caldas, D. W., Gomes, J. R., de Oliveira, J. M., Salaro, A. L., Rocha, J. S. & Zuanon, J. A. S. (2017). *Curcuma longa* as additive in the diet for *Astyanax aff. bimaculatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 43(3), 691-702.

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.

Figueiredo Junior, C. A., & Valente Junior, A. S. (2008). Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual. In *Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural* (Vol. 46).

Forwood, J. M., Harris, J. O., & Deveney, M. R. (2013). Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Journal of fish diseases*, 36(11), 939-947.

Freire, M. M. (2006). Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Freire, M. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., Jardim, C. M., Barcelos, R. C., & Valente, V. M. M. (2012). Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. *Journal of Food Safety*, 32(1), 29-36.

Furuya, W. M. (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. *Toledo: GFM*, 100.

Gichuru, N. N., Manyala, J. O., & Raburu, P. O. (2019). Some aspects of reproduction and feeding habits of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in three dams in Uasin Gishu County, Kenya. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 24(2), 181-189.

Gomes, L. D. C. (2007). Physiological responses of pirarucu (*Arapaima gigas*) to acute handling stress. *Acta Amazonica*, 37(4), 629-633.

- Hayashi, C., Boscolo, W. R., Soares, C. M., Boscolo, V. R., & Galdioli, E. M. (1999). Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 21, 733-737.
- Heluy, G. M., Ramos, L. R. V., Pedrosa, V. F., Sarturi, C., Figueiredo, P. G. P., Vidal, L. G. P., França, I. de F. & Pereira, M. M. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil as an additive in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings reared in salinized water. *Aquaculture Research*, 1-7.
- Hoseini, S. M., & Yousefi, M. (2019). Beneficial effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on oxytetracycline-induced stress response, immunosuppression, oxidative stress and enzymatic changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture nutrition*, 25(2), 298-309.
- Hoseini, S. M., Yousefi, M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2019). Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene-or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 506, 246-255.
- İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(14), 3943-3946.
- Igarashi, M. A. (2018). Aspectos tecnológicos e perspectivas de desenvolvimento do cultivo de tilápia no Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 21(3).
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M. Kluz, M. & Ivanišová, E. (2017). The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1108-1116.
- Kamel, C. (2001). Natural plant extracts: Classical remedies bring modern animal production solutions. *Cahiers options méditerranéennes*, 54(3), 31-38.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2000). Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, 287(1), 46-53.
- Lee, D. H., Ra, C. S., Song, Y. H., Sung, K. I., & Kim, J. D. (2012). Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(4), 577.
- Lèveque, C. (2002). Out of Africa: The Success Story of Tilapias. *Environmental Biology of Fishes*, 64(4).
- 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.

Ljubojević, D. B. (2017). Antibiotic Resistance in Fish. *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*, 102.

Lopes, J. M., de Freitas Souza, C., Saccol, E. M. H., Pavanato, M. A., Antoniazzi, A., Rovani, M. T., Heinzmann, B. M. & Baldisserotto, B. (2019). *Citrus x aurantium* essential oil as feed additive improved growth performance, survival, metabolic, and oxidative parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture nutrition*, 25(2), 310-318.

Mair, G. C., & Little, D. C. (1991). Population control in farmed tilapias. *Naga, the ICLARM Quarterly*, 14(3), 8-13.

Malheiros, D. F., Maciel, P. O., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2016). Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455, 81-86.

Mattioli, C. C., Takata, R., Leme, F. D. O. P., Costa, D. C., & Luz, R. K. (2019). Physiological and metabolic responses of juvenile *Lophiosilurus alexandri* catfish to air exposure. *Fish physiology and biochemistry*, 45(1), 455-467.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(8), 619-633.

Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., & Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, 69(05), 413-419.

Ministério da Saúde (2015). Monografia da espécie *Mentha x piperita* L. (HORTELÃ PIMENTA), Ministério da Saúde e Anvisa, Brasília, Brasil.

Olusola, S. E., Emikpe, B. O., & Olaifa, F. E. (2013). The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 404-412.

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.

Paital, B. (2014). Modulation of redox regulatory molecules and electron transport chain activity in muscle of air breathing fish *Heteropneustes fossilis* under air exposure stress. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(1), 65-76.

Paital, B., & Chainy, G. B. N. (2012). Effects of salinity on O₂ consumption, ROS generation and oxidative stress status of gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), 228-237.

Parodi, T. V., Cunha, M. A., Becker, A. G., Zeppenfeld, C. C., Martins, D. I., Koakoski, G., Barcellos, L. G., Heinzmann, B. M. & Baldisserotto, B. (2014). Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino

and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), 323-334.

Peixe BR. (2020). Anuário Peixe Br da Piscicultura 2020.

Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Londero, É. P., Bressan, C. A., Ourique, G. M., Rizzetti, T. M., Prestes, O. D., Zanella, R. Baldisserotto, B. & Pavanato, M. A. (2018). Protective effect of quercetin against oxidative stress induced by oxytetracycline in muscle of silver catfish. *Aquaculture*, 484, 120-125.

Platel, K., & Srinivasan, K. (2000). Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Food/Nahrung*, 44(1), 42-46.

Poolsawat, L., Li, X., He, M., Ji, D., & Leng, X. (2019). *Clostridium butyricum* as probiotic for promoting growth performance, feed utilization, gut health and microbiota community of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Nutrition*, 26(3), 657-670.

Reda, R. M., Ibrahim, R. E., Ahmed, E. N. G., & El-Bouhy, Z. M. (2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(4), 241-248.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.

Riachi, L. G., & De Maria, C. A. (2015). Peppermint antioxidants revisited. *Food chemistry*, 176, 72-81.

Ribeiro, S. C., Castelo, A. S., Silva, B. M. P. D., Cunha, A. D. S., Proietti Junior, A. A., & Oba-Yoshioka, E. T. (2016). Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Acta Amazonica*, 46(1), 99-106.

Ribeiro, S. C., Malheiros, D. F., Guilozi, I. C., Majolo, C., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., De Assis, H. C. S., Tavares-Dias, M. & Yoshioka, E. T. O. (2018). Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. *Aquaculture*, 490, 29-34.

Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., Nguyen, P. T., Telfer, T. C., & Van Den Brink, P. J. (2012). Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 75-93.

Sabbag, O. J., Rozales, R. D. R., Tarsitano, M. A. A., & Silveira, A. N. (2007). Análise econômica da produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em um modelo de propriedade associativista em Ilha Solteira/SP. *São Paulo. Custos e agronegócio online*, 3(2), 86-100.

Saccol, E. M. H., Uczay, J., Pês, T. S., Finamor, I. A., Ourique, G. M., Riffel, A. P. K., Schmidt, D; Caron, B. O.; Heinzmann, B. M.; Llesuy, S. F., Lazzari, R., Baldisserotto, B. & Pavanato, M. A. (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown essential oil to the diet of the silver

catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, 416, 244-254.

Santos, L., & Ramos, F. (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in food science & technology*, 52, 16-30.

Sena, A. C., Teixeira, R. R., Ferreira, E. L., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Caron, B. O., Schmidt, D., Couto, R. D. & Copatti, C. E. (2016). Essential oil from *Lippia alba* has anaesthetic activity and is effective in reducing handling and transport stress in tambacu (*Piaractus mesopotamicus* × *Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 465, 374-379.

Shalaby, A. M., Khattab, Y. A., & Abdel Rahman, A. M. (2006). Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12(2), 172-201.

Singh, R., Shushni, M. A., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3), 322-328.

Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T., & Marian, M. P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237(1-4), 9-20.

Soleimani, N., Hoseinifar, S. H., Merrifield, D. L., Barati, M., & Abadi, Z. H. (2012). Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & shellfish immunology*, 32(2), 316-321.

Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish physiology and biochemistry*, 41(1), 165-175.

Souza, M. L. de, & Maranhão, T. C. F. (2001). Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 23, 897-901.

Sutili, F. J., Gatlin III, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716-726.

Svalheim, R. A., Burgerhout, E., Heia, K., Joensen, S., Olsen, S. H., Nilsen, H., & Tobiassen, T. (2019). Differential response to air exposure in crowded and uncrowded Atlantic cod (*Gadus morhua*): Consequences for fillet quality. *Food bioscience*, 28, 15-19.

Talpur, A. D. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 420, 71-78.

- Tanjung, R. R. M., Zidni, I., Iskandar, I., & Junianto, J. (2019). Effect of difference filter media on Recirculating Aquaculture System (RAS) on tilapia (*Oreochromis niloticus*) production performance. *World Scientific News*, 118, 194-208.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), 1231-1249.
- Valipour, A., Nedaei, S., Noori, A., Khanipour, A. A., & Hoseinifar, S. H. (2019). Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). *Aquaculture*, 504, 121-130.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., Silva, T. F. A. & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 48(11), 5640-5649.
- Van den Broek, G. (2000). Alternatives to antibiotics. *Feed Mix Special*.
- Waibel, P. E., Halvorson, J. C., Noll, S. L., Hoffbeck, S. L., & Daniels, H. (1991). Influence of virginiamycin on growth and efficiency of large white turkeys. *Poultry science*, 70(4), 837-847.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., & Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151.
- Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Da Cunha, M. A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 933-940.
- Zeppenfeld, C. C., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Salbego, J., Koakoski, G., dos Santos, A. C., Heinzmann, B. M., da Cunha, M. A., Barcellos L.J.G., Pavanato, M. A., Caron, B. O. & Baldisserotto, B. (2017). *Aloysia triphylla* essential oil as food additive for *Rhamdia quelen*—Stress and antioxidant parameters. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1362-1367.
- 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. C., Buentello, J. A., & Gatlin III, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309(1-4), 253-257.

CAPÍTULO 2

Dietary supplementation with *Mentha piperita* essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia

Dietary supplementation with *Mentha piperita* essential oil improves the growth performance, biochemical parameters, digestive enzyme activities and body composition of Nile tilapia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential effects of dietary supplementation with peppermint (*Mentha piperita*) essential oil (EOP) on the growth performance, biochemical parameters, enzyme digestive activities and whole-body composition of Nile tilapia. A sextuplicate feed trial was conducted with seven treatments: diets (313.6 g kg⁻¹ crude protein and 4565.31 kcal kg⁻¹ crude energy) supplemented with 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ EOP for eight weeks. Dietary supplementation with 1.2 g kg⁻¹ EOP significantly increased weight gain, specific growth rate and the protein efficiency rate of the fish. The treatments with 0.0 and 1.0 g kg⁻¹ EOP resulted in a better feed conversion ratio and feed efficiency of the fish. Liver glycogen content was higher in fish fed diets with 0.0, 0.2 and 1.2 g kg⁻¹ EOP; however, a decrease in the muscle glycogen content was observed in fish fed 1.2 g kg⁻¹ EOP in the diet. Plasma glucose and lactate levels were higher in fish fed 0.8 and 0.4-1.0 g kg⁻¹ EOP in the diets, respectively. The EOP dietary inclusion increased plasma total cholesterol levels, and plasma triglyceride levels were reduced in fish fed 0.0 and 0.8-1.2 g kg⁻¹ EOP. Dietary supplementation with EOP improved plasma HDL and LDL in fish and reduced aspartate aminotransferase activity. The plasma alanine aminotransferase activity was reduced in fish fed 0.0, 0.2, 0.8-1.2 g kg⁻¹ EOP, and the plasma lactate dehydrogenase activity was reduced in fish fed 0.0, 0.2, 0.4, 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ EOP. Dietary supplementation with EOP increased intestinal enzyme activities, increased protein and reduced lipid content in the carcass of fish. Supplementation with 1.2 g kg⁻¹ EOP improved the growth performance, activity of intestinal enzymes and whole-body composition of Nile tilapia.

Key words: Growth promoter; Intestinal enzymes; Menthol; Peppermint; Phytoadditive

1. Introduction

Growth-promoting feed additives are used to improve the productivity of fish farming (El-Haroun et al., 2006), as they favor weight gain, survival rate, yield and carcass quality (Chakraborty et al., 2014). Antibiotics, for example, were used in subtherapeutic dosages as growth promoters because in addition to having a positive effect on productive performance, they also have an effect on the prevention of infectious diseases (Reda et al., 2013). However, their use present serious risks to human health because such substances leave residues in the fish muscle intended for consumption, and in the environment such residues are related to the emergence of resistant pathogenic bacteria (Ljubojević, 2017). Consequently, the European Union and China established strict laws in 2006 and 2003, respectively, banning the use of antibiotics in animal production (Santos & Ramos, 2016).

Essential oils have the potential to replace antibiotics as growth promoters (Ljubojević, 2017). They are secondary metabolites of plants concentrated with terpenoid substances and their derivatives (acids, alcohols, phenols, ketones, ethers, aldehydes and esters), which are safe for the consumer and the environment as they are natural products (Sutuli et al., 2018). Among other benefits, their use in fish diets can improve growth, body composition, metabolic variables and serum biochemistry (Ferreira et al., 2014; Acar et al., 2015; Zeppenfeld et al., 2016).

Peppermint (*Mentha piperita*) is a plant produced worldwide and has an essential oil widely used in the pharmaceutical, food and cosmetics industries (Singh et al., 2015). The peppermint essential oil (EOP) is mainly composed of menthol (31-54%), menthone (7-21%) and menthyl acetate (4-13%) (Freire et al., 2012; Ribeiro et al., 2018; De Souza Silva et al., 2019). Menthol and menthone are the most volatile constituents (Mckay & Blumberg, 2006), and menthol is related to antiseptic, appetite stimulating and digestive properties (Kamel, 2001) and antimicrobial activity (İşcan et al., 2002). Diets supplemented with extracts of peppermint improved zootechnical and biochemical parameters, as well as the activity of digestive enzymes of several fish species (Talpur, 2014; Adel et al., 2015a, b). Dietary supplementation with EOP by spraying (alcoholic vehicle) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Streptococcus agalactiae* promoted greater resistance for fish to the pathogen but did not improve fish growth performance (De Souza e Silva et al., 2019). The method of incorporating essential oils can influence their stability in diets, therefore the addition of essential oil along with the lipid fraction during the mixing of ingredients is a way that minimizes the volatilization of its compounds (Sutuli et al., 2018).

The production and consumption of Nile tilapia has shown accelerated growth in several countries in recent years (FAO, 2020). This species is rustic (Gichuru et al., 2019), presents

rapid growth and it is widely grown in intensive systems (Santos et al., 2019). Consequently, this study aims to evaluate the effects of dietary supplementation (during the preparation of the diets) with the essential oil of *M. piperita* as a growth promoter on the activity of digestive enzymes, biochemical parameters and the composition of the carcass of Nile tilapia.

2. Materials and methods

2.1 Ethics statement

The experiment was conducted in LaNup (Laboratório de Nutrição e Produção de Peixes) from the teaching, research and extension unit of a fish farm from the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Ethical approval was granted by the Ethics Committee on the Use of Farm Animals at the Federal University of Viçosa (CEUAP/UFV - n° 38/2016).

2.2 Experimental design and diets

A completely randomized design with seven treatments (diets with 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ of EOP) and six replicates was used. The diets were formulated to be isoproteics (313.60 g kg⁻¹) and isocalorics (4565.31 kcal kg⁻¹) with increasing EOP levels added in substitution of kaolin (Table 1).

The macroingredients were finely ground with a knife mill (Nogueira[®], DPM-Junior M.F., São João da Boa Vista, SP, Brazil), sieved and weighed on a precision scale (Shimadzu[®], BL3200H, Kyoto, Japan). Then, the micro ingredients were weighed (Shimadzu[®], BL3200H) and manually mixed with the macro ingredients. The EOP was previously mixed with soy oil and added to the mixture. The diets were pelleted in an electric meat grinder (Filizola[®], P-22, São Paulo, SP, Brazil) and dried in a forced air circulation oven (Marconi[®], MA 035, Piracicaba, SP, Brazil) at 35 °C for 24 h. The pellets were crushed in a grain mill (Botini[®], Botini-1079, Bilac, SP, Brazil) and sieved (A Bronzinox[®], Santo Amaro, SP, Brazil) to obtain pellets with 0.5 to 3.0 mm.

The chemical composition of the experimental diets was analyzed: dry matter - official method 934.01, AOAC 2016, crude protein Kjeldahl N × 6.25 - official method 984.13, AOAC 2016, crude lipid with Soxhlet extractor - official method 920.39, AOAC 2016, ashes - official method 942.05, AOAC 2016, and crude fiber - official method 962.09, AOAC 2016. The crude energy was determined with a calorimetric pump (IKA[®]-Werke, C5003 control, Satufen, Germany) (Table 2). The EOP chemical composition was carried out by the manufacturer LASZLO[®]. High-performance gas chromatography was performed using the steam distillation

method: column: DB-Wax 30 m x 0.25 mm (J&W Scientific); temperatures: column: 40.0 °C (1 min), 3.0 °C min⁻¹, until 150.0 °C; injector: 250.0 °C, split: 1,200⁻¹; FID detector: 250.0 °C, injection volume: 1 µl (concentration of 0.50 % hexane).

Table 1. Formulation diets (g kg⁻¹) supplemented with peppermint essential oil (EOP).

Ingredients ¹	EOP (g kg ⁻¹)						
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
Soybean meal	565.00	565.00	565.00	565.00	565.00	565.00	565.00
Corn meal	264.50	264.50	264.50	264.50	264.50	264.50	264.50
EOP	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
Wheat bran	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
Kaolin	10.00	9.80	9.60	9.40	9.20	9.00	8.80
L - Lysine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DL - Methionine	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60
Soy oil	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Dicalcium phosphate	33.20	33.20	33.20	33.20	33.20	33.20	33.20
Limestone powder	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Common salt	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Premix ²	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
BHT ³	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

¹ Formulation based on Brazilian tables for the nutrition of tilapia (Furuya, 2010).

² Security levels per kilogram of product: Vit. A: 1,200,000 UI; Vit. D3: 200,000 UI; Vit. E: 12,000 mg; Vit. K3: 2,400 mg; Vit. B1: 4,800 mg; Vit. B2: 4,800 mg; Vit. B6: 4,000 mg; Vit. B12: 4,800 mg; Folic acid: 1,200 mg; Calcium pantothenate: 12,000 mg; Vit. C: 48,000 mg; Biotin: 48.0 mg; Choline: 65,000 mg; Niacin: 24,000 mg; Iron: 10,000 mg; Copper: 6,000 mg; Manganese: 4,000 mg; Zinc: 6,000 mg; Iodide: 20.0 mg; Cobalt: 2.0 mg; Selenium: 20.0 mg.

³ Butyl hydroxy toluene.

Table 2. Chemical composition (based on dry matter) of diets supplemented with peppermint essential oil (EOP).

Chemical composition	EOP (g kg ⁻¹)						
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
Dry matter (g kg ⁻¹)	892.40	899.06	901.40	896.30	892.00	892.00	896.70
Crude protein (g kg ⁻¹)	315.90	312.60	313.40	311.30	315.40	311.60	310.20
Energy (kcal kg ⁻¹)	4561.84	4540.74	4554.91	4572.00	4563.80	4602.74	4561.16
Ether extract (g kg ⁻¹)	46.50	48.40	50.50	48.00	54.40	48.90	50.70
Crude fiber (g kg ⁻¹)	56.80	51.30	54.30	57.50	52.50	54.50	54.40
Ashes (g kg ⁻¹)	107.20	105.00	106.40	105.20	107.80	103.10	106.80
Energy:Protein ¹	14.44	14.53	14.53	14.69	14.47	14.77	14.70
Menthol (mg kg ⁻¹) ²	0.00	93.00	186.00	279.00	372.00	465.00	558.00
Menthone (mg kg ⁻¹) ²	0.00	52.40	104.80	157.20	209.60	262.00	314.40
Neomenthol (mg kg ⁻¹) ²	0.00	22.40	44.80	67.20	89.60	112.00	134.40
Menthyl acetate (mg kg ⁻¹) ²	0.00	11.40	22.80	34.20	45.60	57.00	68.40
Isomenthol (mg kg ⁻¹) ²	0.00	5.80	11.60	17.40	23.20	29.00	34.80
β-caryophyllene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	2.80	5.60	8.40	11.20	14.00	16.80
1,8-cineole (mg kg ⁻¹) ²	0.00	1.80	3.60	5.40	7.20	9.00	10.80
Isomenthone (mg kg ⁻¹) ²	0.00	1.20	2.40	3.60	4.80	6.00	7.20
Limonene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
α-terpinene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	0.40	0.80	1.20	1.60	2.00	2.40
α-pinene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
β-pinene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20
p-cimene (mg kg ⁻¹) ²	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20

¹ Energy:Protein = kcal of energy kg⁻¹ of dry matter / g of protein kg⁻¹ of dry matter.

² Values were calculated according to the chemical composition of peppermint essential oil (Laszlo®): menthol 46.50%; menthone 26.20%; neomenthol 11.20%; menthyl acetate 5.70%; isomenthol 2.90%; β-caryophyllene 1.40%; 1,8-cineole 0.90%; isomenthone 0.60%; limonene 0.50%; α-terpinene 0.20%; α-pinene 0.10%; β-pinene 0.10% and p-cimene 0.10%.

2.3 Fish and experimental conditions

Nile tilapia juveniles (0.58 ± 0.13 g) were distributed in 42 tanks (70 L) at a stocking density of 20 fish per tank. The tanks were maintained in a recirculation system (1.7 L min^{-1}) and equipped with continuous aeration, controlled temperature, mechanical and biological filters. The laboratory photoperiod was adjusted to 12 h, controlled with an analogical timer.

The water temperature (26.81 ± 0.48 °C) and dissolved oxygen levels ($6.07 \pm 0.84 \text{ mg L}^{-1}$) were measured daily (multiparameter YSI-550A, Yellow Springs, OH, EUA). The water pH (6.85 ± 0.30) and total ammonia ($0.19 \pm 0.17 \text{ mg L}^{-1}$) were measured weekly with colorimetric kits (LabconTest Alcon®, Camboriú, SC, Brazil). The non-ionized ammonia ($0.001 \pm 0.001 \text{ mg L}^{-1}$) was calculated according to Emerson et al. (1975). The tanks were cleaned weekly by siphoning with a 10% water change. The fish were fed daily *ad libitum* for eight weeks at 8, 11, 14 and 17 h.

2.4 Sampling collection

After eight weeks of the experiment, the fish ($n = 102$ per treatment) were fasted for 24 h and then euthanized in clove oil immersion (400 mg L^{-1}). The fish were counted and weighed to calculate the survival rate, weight gain, feed conversion, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency rate.

The fish blood ($n = 30$ per treatment) was collected using a heparinized syringe through cut in the caudal peduncle region and was used to determine the plasmatic levels of glucose, lactate, total cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) and the activity of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH). The blood samples were centrifuged for 15 min at 7000 g (Nova Técnica®, NT 805, Piracicaba, SP, Brazil), and the collected plasma was stored at -20 °C.

Subsequently, the liver and viscera of the fish were collected ($n = 60$ per treatment) and weighed separately for the calculation of the hepatosomatic and viscerosomatic indexes, respectively.

The remaining fish ($n = 18$ per treatment) were euthanized in clove oil immersion (400 mg L^{-1}) two hours after feeding. To evaluate the activity of the digestive enzymes total protease, lipase and amylase, the intestine of fish was collected and preserved at -80 °C. Furthermore, 200 mg of liver and muscle were collected to measure the hepatic and muscular glycogen content, respectively. After collection, liver and muscle samples were immediately placed in test tubes with potassium hydroxide solution (30% KOH). The carcass of fish was considered

the body eviscerated with head to calculate the carcass yield and for the chemical composition analyses.

2.5 Growth performance

The growth variables were calculated using the following equations:

Survival rate (SR) = (final number of fish/initial number of fish) × 100

Weight gain (WG) = final biomass – initial biomass

Feed conversion (FC) = feed consumed/weight gain

Feed efficiency (FE) = weight gain/feed consumed

Specific growth rate (SGR) = $[(\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) \times 100] / \text{experimental days}$

Protein efficiency ratio (PER) = weight gain/protein consumed

Hepatosomatic index (HI) = (liver weight/fish weight) × 100

Viscerosomatic index (VI) = (viscera weight/fish weight) × 100

Carcass yield (CY) = (carcass weight/fish weight) × 100

2.6 Biochemical parameters

The extraction and quantification of hepatic and muscular glycogen content were measured according to Carrol et al. (1956). After the dissolution of samples in 30% KOH, the extraction phase of glycogen content was carried out using Na₂SO₄ and absolute alcohol, the samples were centrifuged (206-R, Fanem[®], São Paulo, SP, Brazil) at 500 g for 10 min, and the precipitate was resuspended in distilled water. The anthrone reagent was added to the solution, and the samples were read in a spectrophotometer at 620 nm for the quantification phase of glycogen content.

The concentrations of glucose, lactate, total cholesterol, triglycerides, HDL, and LDL and the activities of AST, ALT and LDH were measured in the plasma. The plasma analyses were performed with Bioclin kits (Quibasa[®] – Quimica básica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and the reading of the samples with BS 200 equipment (Mindray[®], Clinical Chemistry Analyzer, Shenzhen, Guangdong Province, China) at the wavelengths indicated by the manufacturer.

2.7 Digestive enzyme activity

The enzymatic extract was obtained from maceration of the intestine using a porcelain mortar and pistil in baths of liquid nitrogen. Subsequently, 5 mL of water (pH 3.0) was added

to the macerated intestinal tissue and then centrifuged at 10,000 g for 20 min (4 °C). The supernatant collected was used to determine the total protein concentration and digestive enzyme activity.

The total protein content was measured according to the Bradford (1976) protocol using bovine serum albumin (BSA) as a standard and readings using a spectrophotometer at 595 nm. The total protease activity was evaluated according to Tomarelli et al. (1949) with a spectrophotometer at 440 nm. The determination of lipase and amylase activities was performed using enzymatic kits (Bioclin[®]) following the manufacturer recommendations, based on Cherry & Crandall (1932) and Caraway (1959), respectively.

2.8 Whole-body composition

A *pool* with 13 fish per tank ($n = 78$ per treatment) was made to determine the fish whole-body composition. The samples were predried in a forced air circulation oven (Marconi[®], MA 035, Piracicaba, SP, Brazil) at 60 °C for 48 h, sectioned with scissors and ground with a ball mill. Subsequently, the analyses of dry matter (official method 934.01, AOAC 2016), crude protein Kjeldahl $N \times 6.25$ (official method 984.13, AOAC 2016), crude lipid with Soxhlet extractor (official method 920.39, AOAC 2016) and ashes (official method 942.05, AOAC 2016) were performed. The crude energy was determined with a calorimetric pump (IKA[®]-Werke, C5003 control, Satufen, Germany).

2.9 Statistical analyses

The Shapiro-Wilk and Barlett tests confirmed normal distribution and homogeneity of variance, respectively, at 5% of significance. One-way analyses of variance (ANOVA) followed by the post hoc Tukey's test at the significance level of $p < 0.05$ was used to compare the differences among the treatments. In addition, the polynomial contrast was performed to verify the linear and quadratic effects. The most significant ($p < 0.05$) of these trends (linear or quadratic) was reported. All statistical analyses were performed using the R software version 3.5.1.

3. Results

3.1 Growth performance

Fish fed with diets supplemented with 1.2 g kg⁻¹ EOP showed the highest weight gain (Figure 1A). The best values for feed conversion rate and feed efficiency were observed for fish

fed with the control diet (0.0 g kg^{-1} of dietary EOP) and 1.0 g kg^{-1} of dietary EOP (Figure 1B and 1C), although a negative linear trend was verified for feed efficiency (Table 3). Fish fed with diets containing 1.2 g kg^{-1} EOP showed the highest specific growth rate (Figure 1D). The same was observed for the protein efficiency rate; however, fish fed with 0.2 and 1.0 g kg^{-1} of dietary EOP showed no differences from those fed with 1.2 g kg^{-1} of EOP (Figure 1E).

There was no significant difference in fish survival rate, carcass yield, or hepatosomatic and viscerosomatic indexes (Table 3).

3.2 Biochemical parameters

The highest concentrations of hepatic glycogen were observed in the fish from the control group and those fed with 0.2 and 1.2 g kg^{-1} EOP (Figure 2A). Fish fed with 1.2 g kg^{-1} dietary EOP also presented the lowest concentration of muscle glycogen (Figure 2B) and a significant quadratic trend was verified (Table 4).

Fish fed with a diet supplemented with 0.8 g kg^{-1} EOP presented the highest plasma glucose concentration (Figure 3A) and a positive linear trend was verified (Table 4). The plasma lactate concentration was higher in fish fed the diets containing 0.4 to 1.0 g kg^{-1} EOP (Figure 3B). The fish plasma total cholesterol concentration was higher in fish fed 0.8 and 1.0 g kg^{-1} of dietary EOP (Figure 3C). Fish that received a diet supplemented with 0.40 g kg^{-1} EOP presented the highest concentration of plasma triglycerides (Figure 3D) and a significant quadratic trend was verified (Table 4). For plasma HDL and LDL, the lowest values were observed for fish fed with 1.0 and 1.2 g kg^{-1} EOP (Figure 3E and 3F) and a significant quadratic trend was verified for those variables (Table 4).

Fish that received diets supplemented with 0.6 g kg^{-1} EOP presented the lowest AST activity and highest ALT and LDH activity (Figure 4A, 4B and 4C).

Table 3. Survival rate (SR), weight gain (WG), feed conversion (FC), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR), protein efficiency rate (PER), hepatosomatic index (HI), viscerosomatic index (VI) and carcass yield (CY) (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks.

	EOP (g kg ⁻¹)							ANOVA* (p-value)	P.C. (p-value)	
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20		L	Q
SR (%)	100.00 $\pm$ 0.00	96.67 $\pm$ 8.17	99.17 $\pm$ 2.04	99.17 $\pm$ 2.04	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	0.552	-	-
WG (g)	19.26 $\pm$ 0.37 ^b	17.20 $\pm$ 0.35 ^{cd}	17.60 $\pm$ 0.41 ^c	16.58 $\pm$ 0.48 ^d	15.63 $\pm$ 0.4 ^e	17.63 $\pm$ 0.43 ^c	20.19 $\pm$ 0.36 ^a	< 0.001	0.611	0.093
FC	0.91 $\pm$ 0.10 ^d	1.07 $\pm$ 0.10 ^c	1.21 $\pm$ 0.04 ^b	1.09 $\pm$ 0.05 ^{bc}	1.35 $\pm$ 0.06 ^a	0.88 $\pm$ 0.03 ^d	1.16 $\pm$ 0.11 ^{bc}	< 0.001	0.172	0.436
FE	1.22 $\pm$ 0.08 ^a	1.12 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.93 $\pm$ 0.08 ^{cd}	1.02 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.74 $\pm$ 0.03 ^e	1.21 $\pm$ 0.08 ^a	0.83 $\pm$ 0.05 ^{de}	< 0.001	0.002	0.01
SGR (% day ⁻¹)	5.81 $\pm$ 0.03 ^b	5.62 $\pm$ 0.03 ^{cd}	5.66 $\pm$ 0.04 ^c	5.56 $\pm$ 0.05 ^d	5.47 $\pm$ 0.04 ^e	5.67 $\pm$ 0.04 ^c	5.89 $\pm$ 0.03 ^a	< 0.001	0.697	0.121
PER	3.34 $\pm$ 0.13 ^b	4.07 $\pm$ 0.16 ^a	3.24 $\pm$ 0.19 ^b	3.10 $\pm$ 0.24 ^{bc}	2.86 $\pm$ 0.16 ^c	3.95 $\pm$ 0.26 ^a	3.79 $\pm$ 0.19 ^a	< 0.001	0.475	0.196
HI (%)	1.35 $\pm$ 0.13	1.52 $\pm$ 0.08	1.45 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.12	1.46 $\pm$ 0.08	1.52 $\pm$ 0.27	1.51 $\pm$ 0.12	0.236	-	-
VI (%)	9.99 $\pm$ 0.85	10.58 $\pm$ 0.82	10.26 $\pm$ 0.93	9.96 $\pm$ 0.47	10.65 $\pm$ 1.06	11.06 $\pm$ 0.71	10.63 $\pm$ 0.93	0.266	-	-
CY (%)	86.96 $\pm$ 0.37	86.66 $\pm$ 1.06	87.11 $\pm$ 0.74	88.21 $\pm$ 1.17	87.04 $\pm$ 0.99	86.74 $\pm$ 0.93	87.00 $\pm$ 0.70	0.086	-	-

* Significant difference by one-way ANOVA when $p < 0.05$.

Different superscript letters in a single row indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

P.C.: Polynomial contrasts analysis; L: linear model; Q: quadratic model. ($p < 0.05$).

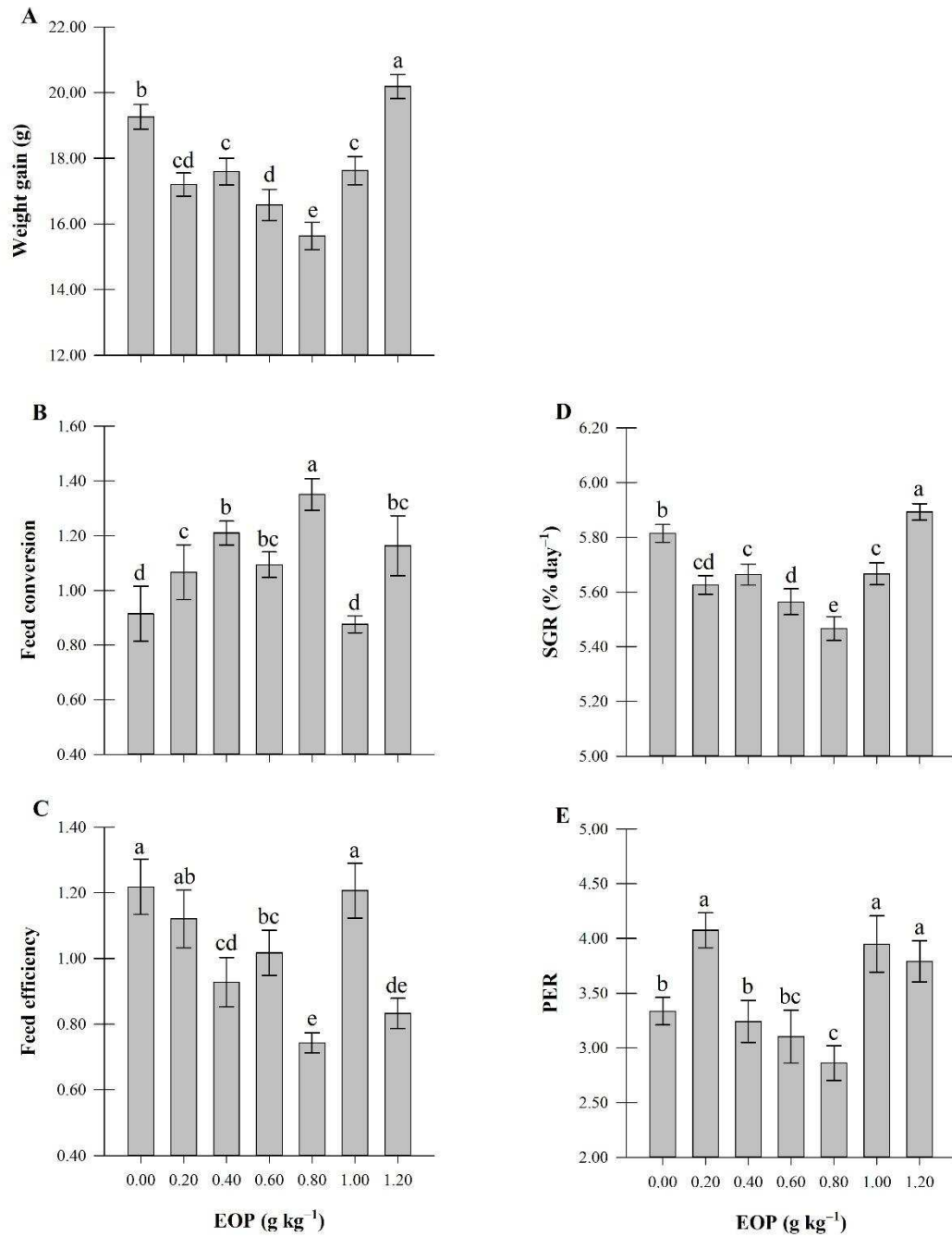


Figure 1. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on weight gain (A), feed conversion rate (B), feed efficiency (C), specific growth rate (SGR) (D) and protein efficiency rate (PER) (E) of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 4. Concentrations (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of hepatic and muscle glycogen, glucose, lactate, total cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) and activities of aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks.

	EOP (g kg ⁻¹)							ANOVA* (p-value)	P.C. (p-value)	
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20		L	Q
Hepatic glycogen (mg 100 mg ⁻¹)	46.37 $\pm$ 2.70 ^a	52.29 $\pm$ 3.50 ^a	34.25 $\pm$ 3.90 ^{bc}	39.18 $\pm$ 2.40 ^b	28.79 $\pm$ 1.94 ^c	36.54 $\pm$ 0.95 ^b	47.22 $\pm$ 1.99 ^a	< 0.001	0.189	0.539
Muscle glycogen (mg 100 mg ⁻¹)	1.23 $\pm$ 0.12 ^{ab}	1.16 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.38 $\pm$ 0.11 ^a	1.15 $\pm$ 0.13 ^{ab}	0.98 $\pm$ 0.11 ^{bc}	1.14 $\pm$ 0.15 ^{ab}	0.81 $\pm$ 0.08 ^c	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Glucose (mg dL ⁻¹)	62.08 $\pm$ 1.28 ^d	63.40 $\pm$ 2.27 ^{cd}	66.91 $\pm$ 1.20 ^b	64.58 $\pm$ 2.11 ^{bcd}	76.17 $\pm$ 2.77 ^a	66.13 $\pm$ 1.68 ^{bc}	63.92 $\pm$ 1.36 ^{bcd}	< 0.001	0.047	0.217
Lactate (mg dL ⁻¹)	23.25 $\pm$ 1.86 ^b	25.61 $\pm$ 1.84 ^b	30.33 $\pm$ 1.77 ^a	31.30 $\pm$ 2.24 ^a	30.20 $\pm$ 1.60 ^a	29.93 $\pm$ 2.52 ^a	23.66 $\pm$ 1.05 ^b	< 0.001	0.206	0.878
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	99.58 $\pm$ 3.50 ^d	113.85 $\pm$ 2.86 ^{ab}	116.00 $\pm$ 3.29 ^a	116.58 $\pm$ 2.87 ^a	106.42 $\pm$ 2.97 ^c	106.17 $\pm$ 3.76 ^c	108.43 $\pm$ 3.34 ^{bc}	< 0.001	0.64	0.682
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	76.50 $\pm$ 2.60 ^c	93.12 $\pm$ 4.85 ^b	105.95 $\pm$ 2.76 ^a	92.15 $\pm$ 2.40 ^b	80.63 $\pm$ 3.09 ^c	80.25 $\pm$ 4.73 ^c	79.60 $\pm$ 4.04 ^c	< 0.001	0.061	0.012
HDL (mg dL ⁻¹)	16.00 $\pm$ 0.63 ^b	18.79 $\pm$ 0.95 ^a	18.83 $\pm$ 1.17 ^a	19.13 $\pm$ 0.99 ^a	14.87 $\pm$ 0.99 ^b	16.00 $\pm$ 0.89 ^b	14.83 $\pm$ 0.98 ^b	< 0.001	0.002	< 0.001
LDL (mg dL ⁻¹)	14.17 $\pm$ 0.29 ^b	16.25 $\pm$ 0.35 ^a	15.33 $\pm$ 0.76 ^{ab}	16.00 $\pm$ 0.41 ^a	15.50 $\pm$ 0.71 ^{ab}	11.75 $\pm$ 0.35 ^c	11.50 $\pm$ 0.50 ^c	< 0.001	0.005	< 0.001
AST (U L ⁻¹)	106.67 $\pm$ 3.14 ^a	110.93 $\pm$ 3.26 ^a	108.61 $\pm$ 2.95 ^a	74.82 $\pm$ 2.74 ^d	89.00 $\pm$ 2.37 ^c	93.90 $\pm$ 1.64 ^b	107.25 $\pm$ 2.10 ^a	< 0.001	0.057	0.286
ALT (U L ⁻¹)	2.00 $\pm$ 0.95 ^b	2.98 $\pm$ 0.60 ^b	4.78 $\pm$ 0.58 ^a	4.97 $\pm$ 0.63 ^a	2.94 $\pm$ 0.65 ^b	2.30 $\pm$ 0.94 ^b	2.98 $\pm$ 0.83 ^b	< 0.001	0.886	0.344
LDH (U L ⁻¹)	22.53 $\pm$ 3.83 ^e	28.31 $\pm$ 4.21 ^{de}	43.99 $\pm$ 2.95 ^c	81.93 $\pm$ 4.42 ^a	59.02 $\pm$ 3.59 ^b	26.90 $\pm$ 4.26 ^{de}	31.00 $\pm$ 2.90 ^d	< 0.001	0.404	0.854

* Significant difference by one-way ANOVA when $p < 0.05$.

Different superscript letters in a single row indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

P.C.: Polynomial contrasts analysis; L: linear model; Q: quadratic model. ($p < 0.05$).

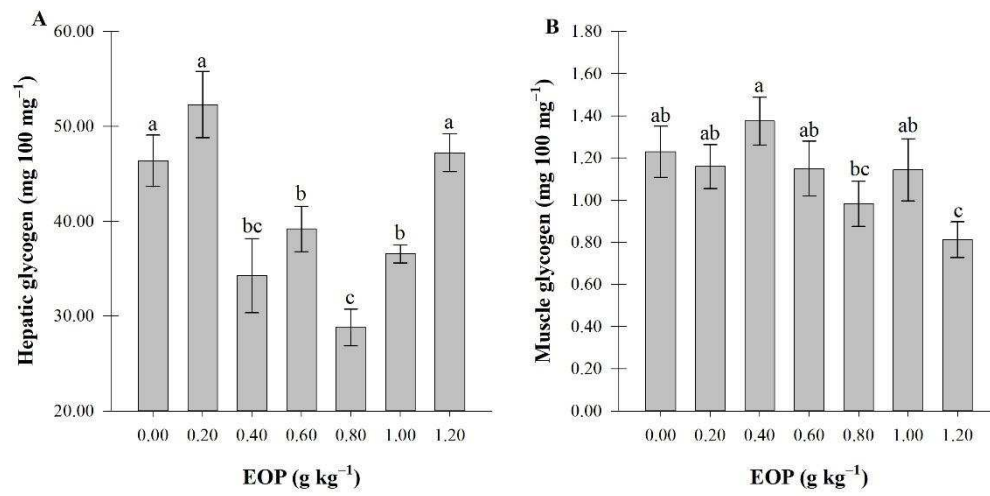


Figure 2. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on the concentration of hepatic glycogen (A) and muscle glycogen (B) in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

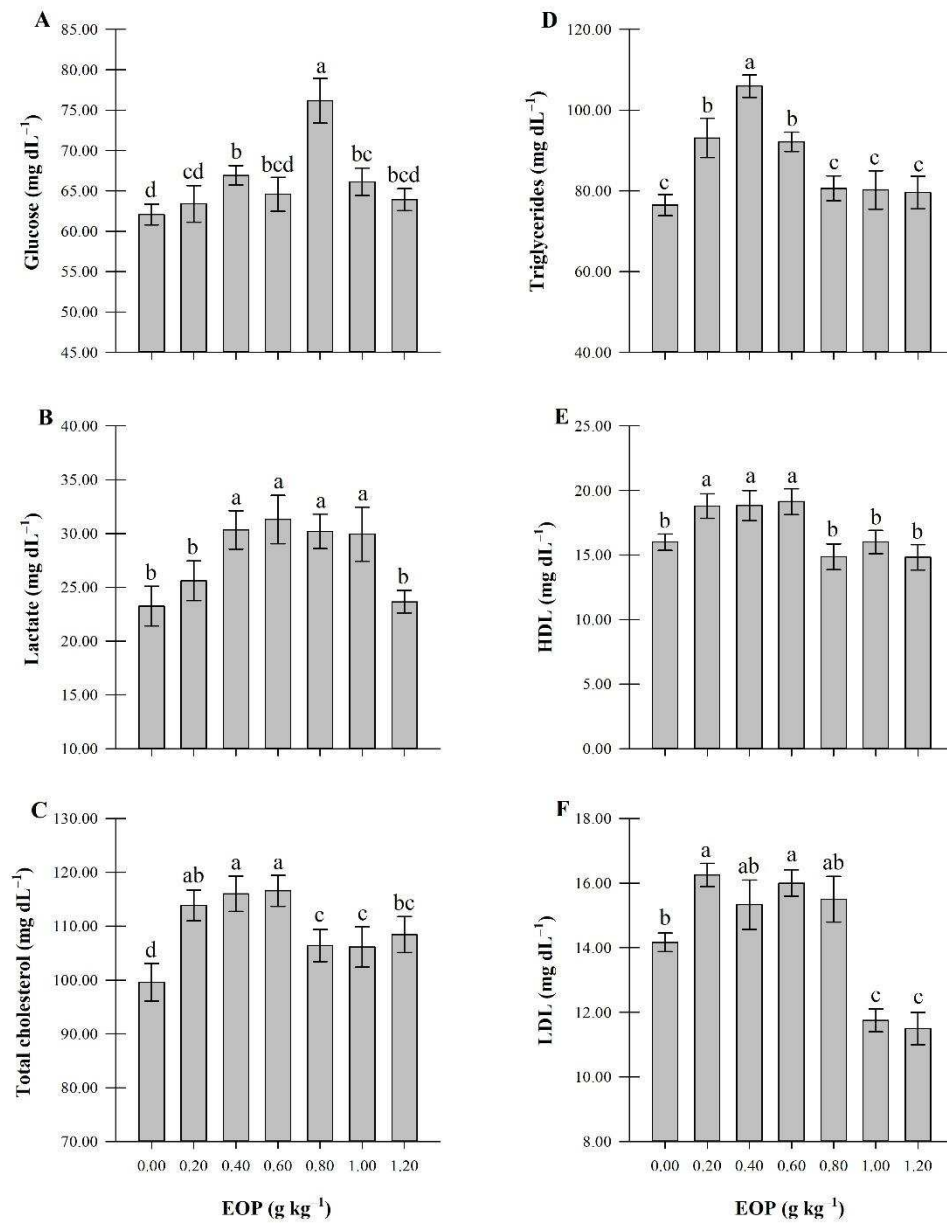


Figure 3. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on glucose (A), lactate (B), total cholesterol (C), triglycerides (D), high-density lipoprotein (HDL) (E) and low-density lipoprotein (LDL) (F) plasma concentrations in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

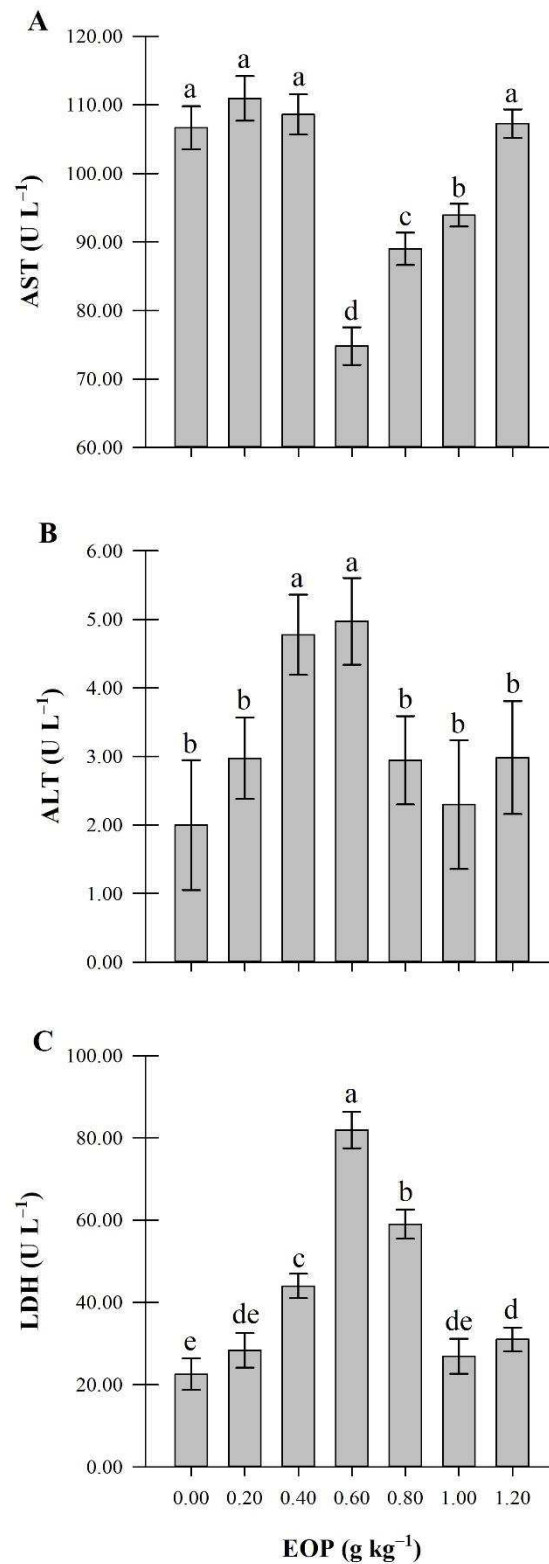


Figure 4. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on aspartate transaminase (AST) (A), alanine aminotransferase (ALT) (B) and lactate dehydrogenase (LDH) (C) plasma concentrations in juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

3.3 Digestive enzyme activities

The total protease activity was higher in the intestine of the fish fed 1.0 g kg^{-1} of dietary EOP (Figure 5A). The lipase activity was higher in Nile tilapia intestines that received 1.0 and 1.2 g kg^{-1} of dietary EOP (Figure 5B). For intestinal amylase activity, fish that received 1.2 g kg^{-1} of dietary EOP showed the highest value (Figure 5C). A significant quadratic trend was verified for all the digestive enzyme activities in this study (Table 5).

3.4 Whole-body composition

The fish fed 1.2 g kg^{-1} of dietary EOP showed the highest value of whole-body crude protein and lowest value of whole-body total lipids. Fish fed the control diet presented the lowest value of whole-body crude protein and the highest value of whole-body total lipids. A significant positive linear trend was verified for whole-body crude protein and also a negative linear trend was verified for total lipid content (Table 6).

Dietary supplementation with EOP did not significantly affect the dry matter, crude energy or ash content of the whole-body fish (Table 6).

Table 5. Digestive enzymes activities (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks.

	EOP (g kg ⁻¹)							ANOVA* (p-value)	P.C. (p-value)	
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20		L	Q
Total protease (U mg protein ⁻¹)	0.77 $\pm$ 0.08 ^b	0.77 $\pm$ 0.09 ^b	0.53 $\pm$ 0.04 ^c	0.54 $\pm$ 0.10 ^c	0.48 $\pm$ 0.06 ^c	1.18 $\pm$ 0.02 ^a	0.81 $\pm$ 0.10 ^b	< 0.001	0.079	0.016
Lipase (U dL ⁻¹ mg protein ⁻¹)	94.02 $\pm$ 6.62 ^c	123.82 $\pm$ 4.13 ^b	93.76 $\pm$ 2.97 ^c	90.83 $\pm$ 6.03 ^c	88.17 $\pm$ 4.28 ^c	148.77 $\pm$ 4.73 ^a	140.70 $\pm$ 4.97 ^a	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Amylase (U dL ⁻¹ mg protein ⁻¹)	273.76 $\pm$ 2.90 ^d	313.30 $\pm$ 7.06 ^c	244.06 $\pm$ 1.73 ^e	221.57 $\pm$ 4.61 ^f	247.84 $\pm$ 6.81 ^e	357.43 $\pm$ 9.11 ^b	404.64 $\pm$ 6.50 ^a	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* Significant difference by one-way ANOVA when $p < 0.05$.

Different superscript letters in a single row indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

P.C.: Polynomial contrasts analysis; L: linear model; Q: quadratic model. ($p < 0.05$).

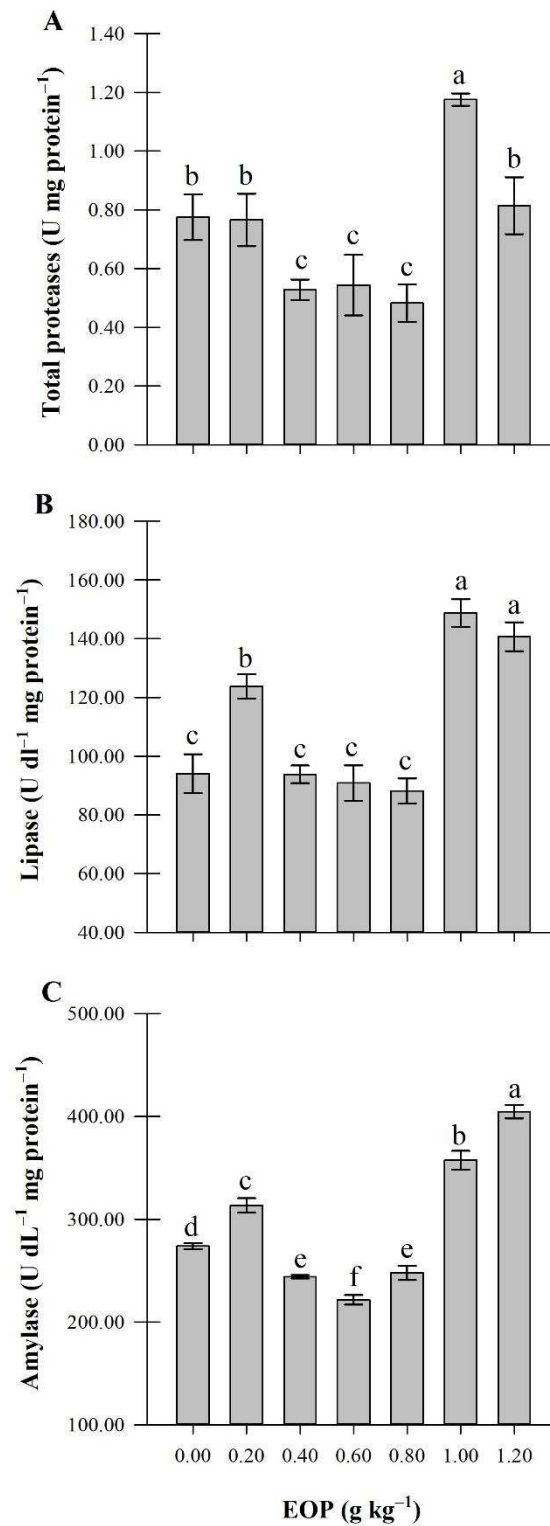


Figure 5. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on total proteases (A), lipase (B) and amylase (C) in the intestine of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

Table 6. Whole-body chemical composition (mean $\pm$ standard deviation of the mean) of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing different levels of peppermint *M. piperita* essential oil (EOP) after eight weeks.

	EOP (g kg ⁻¹)							ANOVA (p-value)	P.C (p-value)	
	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20		L	Q
Dry matter (%)	25.94 $\pm$ 0.56	25.89 $\pm$ 0.59	25.93 $\pm$ 0.40	26.02 $\pm$ 0.70	25.69 $\pm$ 0.71	25.62 $\pm$ 0.68	25.71 $\pm$ 0.91	0.922	-	-
Crude Protein (%) ¹	63.32 $\pm$ 0.56 ^c	63.66 $\pm$ 0.49 ^{bc}	63.99 $\pm$ 0.70 ^{abc}	64.56 $\pm$ 0.38 ^{ab}	64.60 $\pm$ 0.43 ^{ab}	64.07 $\pm$ 0.56 ^{abc}	64.82 $\pm$ 0.65 ^a	<0.001	<0.001	<0.001
Energy (kcal kg ⁻¹) ¹	5266.03 $\pm$ 108.75	5190.04 $\pm$ 107.49	5262.91 $\pm$ 124.02	5211.96 $\pm$ 88.13	5166.78 $\pm$ 156.42	5196.29 $\pm$ 137.91	5178.80 $\pm$ 115.67	0.702	-	-
Ether extract (%) ¹	21.36 $\pm$ 0.12 ^a	19.78 $\pm$ 0.44 ^b	20.21 $\pm$ 0.50 ^b	20.08 $\pm$ 0.35 ^b	19.57 $\pm$ 0.39 ^b	20.02 $\pm$ 0.55 ^b	19.53 $\pm$ 0.47 ^b	<0.001	<0.001	0.001
Ashes (%) ¹	16.15 $\pm$ 0.14	16.85 $\pm$ 0.28	16.45 $\pm$ 0.38	16.44 $\pm$ 0.35	16.62 $\pm$ 0.36	16.80 $\pm$ 0.28	16.70 $\pm$ 0.33	0.067	-	-

¹ Calculus based on dry matter.

* Significant difference by one-way ANOVA when $p < 0.05$.

Different superscript letters in a single row indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$).

P.C.: Polynomial contrasts analysis; L: linear model; Q: quadratic model. ($p < 0.05$).

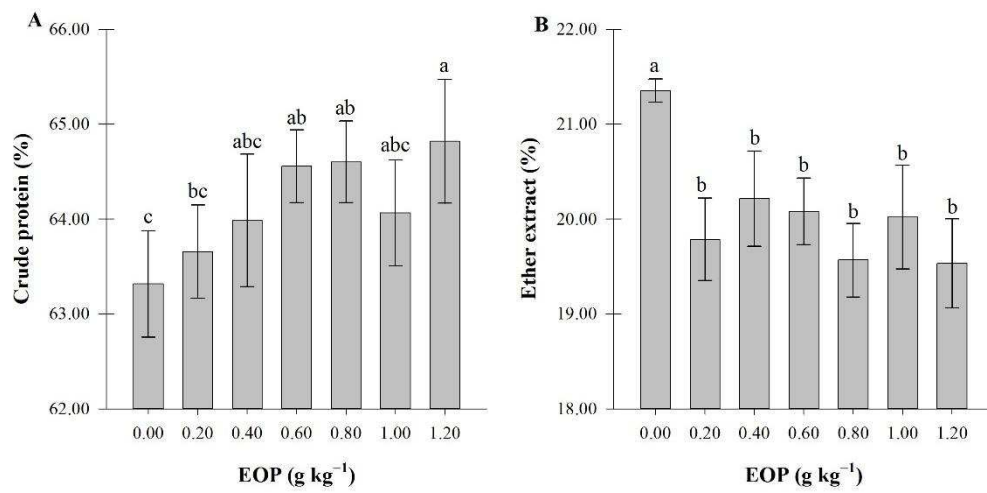


Figure 6. Effect of dietary peppermint essential oil (EOP) levels on carcass concentration of crude protein (A) and ether extract (B) of juvenile Nile tilapia after eight weeks. Different letters represent a difference by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$).

4. Discussion

The hepatosomatic and viscerosomatic indexes, which are used to quantitatively assess the degree of adaptation of the gastrointestinal tract to the food ingested (Ighwela et al., 2014), were not altered in Nile tilapia fed diets supplemented with *M. piperita* essential oil. Thus, the best values observed for weight gain, feed conversion, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency rate in fish fed with 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* may be related to the increased digestibility of nutrients provided by the greater activity of digestive enzymes. Furthermore, these results may also be associated with the changes that the essential oil of *M. piperita* can exert on the intestinal flora, the structure and absorption of nutrients by the fish intestine.

Corroborating the results found in the current study, the dietary supplementation with 30 g kg⁻¹ ethanol extract of *M. piperita* improved weight gain, specific growth rate and feed conversion of *Rutilus frisii kutum* (Adel et al., 2015a) and *Salmo trutta caspius*, and in the intestine of these fish, there was also an increase in the population of lactic acid bacteria (Adel et al., 2015b). Improvements in productive performance were also observed in *Lates calcarifer* fed powdered *M. piperita* leaves at levels of 2.0 to 5.0 g kg⁻¹ (Talpur, 2014). However, for the same species used in the current study, Nile tilapia, dietary supplementation with 0.75, 1.25 and 2.5 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* did not improve productive performance (De Souza e Silva et al., 2019). This divergence between the results may be related to the different amounts of active ingredients in the diets. In the present study, the active ingredients menthol and menthone were at higher concentrations (46.5% menthol and 26.2% menthone) compared to the study of De Souza Silva et al. (2019) (33.8% menthol and 15.2% menthone), which can also contribute to the different results observed.

The improvement of the productive performance of Nile tilapia fed with the highest concentrations of essential oil of *M. piperita* may also be related to the energy metabolism of fish. Glucose can accumulate in the liver and muscle tissues in the form of glycogen as an energy reserve (Hsieh & Shiau, 2000). When glycogen mobilization is necessary to obtain energy, there is a marked increase in the levels of glucose and lactate in the bloodstream (Gomes, 2007). Nile tilapia that received levels 0.4 to 1.0 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* possibly mobilized hepatic glycogen for energy production, as an increase in plasma lactate of these animals was observed, and lactate is one of the main substrates for the pathway of fish gluconeogenesis (Pretto et al., 2013). Although Nile tilapia that received 0.8 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* had a higher concentration of plasma glucose, the plasma glucose of fishes from all treatments was within the reference range for fish species (39 - 96 mg dL⁻¹) (Hrubec,

Cardinale & Smit, 2000). The lowest concentration of muscle glycogen was observed in fish fed with 1.2 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita*, despite the concentration of hepatic glycogen being among the highest. It is likely that at this level of dietary inclusion, the essential oil of *M. piperita* increases insulin levels and inhibits the enzyme glucose-6-phosphatase, which reduces the breakdown of glycogen in the liver and in some way exerts some interference on the action of glucose transporter 4 (GLUT 4) influenced by insulin, which is responsible for the uptake of blood glucose into the muscle tissue (Chung et al., 2010; Moradabadi et al., 2013). Not corroborating the results of the present study, Nile tilapia fed diets supplemented with *Ocimum basilicum* essential oil reduced the concentration of hepatic glycogen, which according to the authors may have occurred due to liver damage caused by this essential oil, mainly at the highest doses, also resulting in reduction of plasma glucose levels (De Souza et al., 2019). On the other hand, dietary supplementation with the ethanolic extract of *M. piperita* at levels of 10 to 30 g kg⁻¹ did not alter the plasma glucose concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Adel et al., 2016) or *S. trutta caspius* (Adel et al., 2015b). The plasma glucose concentration decreased in *L. calcarifer* fed 4.0 and 5.0 g kg⁻¹ powdered *M. piperita* leaves, which, according to the author, may be related to the increase in insulin activity induced by peppermint (Talpur, 2014). The differences observed between these studies and the present study are probably associated with the types of *M. piperita* extractives that were used and the difference in the physiological responses that the fish species may present.

In the present study, the results observed in Nile tilapia fed diets supplemented with 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* indicate that these fish probably used lipids as the main source of energy for their metabolic activities and accumulated part of the energy in the form of hepatic glycogen. The lower triglyceride and LDL plasma levels in fish fed 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ *M. piperita* essential oil may be related to its hypolipidemic effect (Sosa et al., 2020). The essential oil of *Melissa officinalis* has some active principles similar to that of the essential oil of *M. piperita* that promote the activation and induction of the expression of genes that encode the lipoproteins lipase and fatty acid transport proteins (Chung et al., 2010). Limonene is an active ingredient present in these essential oils that alters the expression of genes involved in lipid metabolism (Aanyu et al., 2018). Corroborating the results found in the current study, dietary supplementation with 1.5 and 2.0 g kg⁻¹ of a commercial product composed of a mixture of essential oils (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*) led to higher concentrations of plasma HDL and reduction of plasma LDL in Nile tilapia (Sosa et al., 2020). However, dietary supplementation with 0.25 to 2.0 mL kg⁻¹ of essential oil of *Lippia alba* did not alter plasma levels of triglycerides, cholesterol, HDL and LDL compared to the control diet in silver

catfish *Rhamdia quelen* (Saccol et al., 2013). The essential oil of *L. alba* contains the active compounds limonene, 1-8 cineole and β -karyophyllene (Saccol et al., 2013; Souza et al., 2017), similar to the essential oil of *M. piperita*.

The metabolic enzymes AST and ALT are involved in transamination to maintain the energy cycle (Adams et al., 1996), and the high activity of these enzymes in the plasma may be related to metabolic responses present in the liver (induced by chemicals, infections or physiological factors) and disorders in the Krebs cycle (Shalaby et al., 2006). LDH is related to the increase in energy availability to cells via glucose metabolism by catalyzing the reversible reaction of lactate to pyruvate (Pretto et al., 2013), and it is used as an indicator of hepatotoxicity (Naik et al., 2004). Therefore, the high activity of these enzymes in fish plasma can indicate damage to hepatocytes. The results with the lowest activity of the ALT and LDH enzymes were observed in Nile tilapia, which also showed the best results for productive performance, digestive enzyme activities and energy metabolism. The higher LDH activity in fish that received dietary levels from 0.6 to 0.8 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* justifies the high concentrations of lactate observed in plasma. Diets supplemented with the ethanolic extract of *M. piperita* did not alter the activity of the enzymes AST and ALT of rainbow trout (Adel et al., 2016) and *S. trutta caspius*, and in the last species, there was also no effect on LDH enzyme activity (Adel et al., 2015b). Nile tilapia fed with essential oil of *M. piperita* (38.1% menthol and 29.2% menthone) incorporated into commercial diets using the spraying method with soy oil as a vehicle also did not show significant changes in the activity of AST and ALT (Valladão et al., 2017). However, De Souza et al. (2019) observed that Nile tilapia fed diets containing 0.25 to 0.5 mL kg⁻¹ of essential oil of *O. basilicum* showed a higher concentration of hepatic glycogen and lower ALT activity in the plasma compared to other levels of dietary inclusion of this essential oil (1.0 and 2.0 mL kg⁻¹), indicating that these levels did not present toxicity to fish liver and did not affect glycogen synthesis and storage. In the present study, it was also observed that fish that presented higher concentrations of hepatic glycogen presented lower ALT activity in the plasma.

The inclusion of essential oils in fish diets can stimulate the digestion of nutrients by increasing the production and secretion of intestinal enzymes (Bhosale et al., 2010; De Souza et al., 2019). Sharathchandra et al. (1995) observed that the leaves of *Mentha spicata* supplied to mice stimulated the activity of lipase in the pancreas and intestinal mucosa and stimulated the activity of amylase in the intestine. Such stimuli on the activity of digestive enzymes can be explained by the active principles of phytoadditives. For example, in peppermint, menthol is related to the stimulus of appetite and digestion of nutrients (Kamel, 2001), and limonene is

related to the increase in the expression of genes encoding key enzymes, such as lipoprotein lipase and alkaline phosphatase, involved in the digestion of lipids (Aanyu et al., 2018). In the present study, the highest concentrations of these active principles in diets supplemented with 1.0 and 1.2 g kg⁻¹ of *M. piperita* essential oil led to an increase in the activity of total protease enzymes, lipase and amylase in Nile tilapia. Similarly, dietary supplementation with 20 and 30 g kg⁻¹ of ethanolic extract of *M. piperita* increased the activity of amylase in the intestine of *S. trutta caspius*, but there was no significant difference for protease compared to the control group (Adel et al., 2015b). Similar results were also observed in studies carried out with phytoadditives belonging to the same family of *M. piperita*, such as the essential oils of *Origanum vulgare* and *O. basilicum*, which have some active principles similar to that of the essential oil of *M. piperita*, such as α -terpinene, α -pinene, β -pinene, *p*-cymene and limonene (Ozdemir et al., 2018) and α -pinene, β -pinene, limonene, 1-8 cineol and β -karyophyllene (Kiferle et al., 2019), respectively. The dietary addition of the essential oil of *O. vulgare* at 0.5, 1.5 and 4.5 g kg⁻¹ for common carp, *Cyprinus carpio*, promoted higher activity of the enzymes protease, lipase and amylase (Zhang et al., 2020). Dietary supplementation with the essential oil of *O. basilicum* for Nile tilapia (De Souza et al., 2019) and of its leaves and seeds for *Sparus aurata* (El-Dakar et al., 2015) induced higher amylase and lipase activities in the intestine. These authors related the results found to the stimulus that phytoadditives exert on pancreatic secretion of digestive enzymes (Srinivasan, 2005; Bhosale et al., 2010).

The increased activity of digestive enzymes reduces the availability of substrate for undesirable intestinal bacteria, decreasing their proliferation (Citarasu et al., 2010) and indirectly favoring the population of beneficial bacteria. Another way of modulating the intestinal flora is through the bactericidal action that essential oils exert on pathogenic bacteria (Citarasu et al., 2010; Kačániová et al., 2017; Suttili et al., 2018), through the disruption of the cell wall, blocking protein and DNA synthesis, inhibiting enzyme secretion and interfering with cell signaling mechanisms (Citarasu et al., 2010). The action of the essential oil of *M. piperita* can be related to menthol, which has antimicrobial properties (İşcan et al., 2002).

In addition, peppermint improves intestinal functions related to nutrient absorption capacity and promotes the health and integrity of mucus and intestinal epithelium (Adel et al., 2015b; Valladão et al., 2017). Such benefits can be explained by the regulatory action of limonene on the genes of the mucin-like protein (*muc*) stimulating the secretion of mucus and the oligopeptide transporter 1 (*pept1*), which is responsible for the transport of di/tripeptides from the enterocyte to the bloodstream (Aanyu et al., 2018). Limonene is also related to the increase in RNAm levels of insulin-like growth factor (*igf-I*) (Aanyu et al., 2018).

The results of this study demonstrate that dietary supplementation with 1.2 g kg⁻¹ essential oil of *M. piperita* significantly improved the chemical composition of Nile tilapia carcass, resulting in higher protein deposition and lower fat deposition. Such results can be justified by the improvement of nutrient assimilation by the fish, promoted by the higher secretion of digestive enzymes and by the action on lipid metabolism. Studies suggest that phytoadditives promote lipid metabolism by using body fat catabolism as the main source of energy, prioritizing protein accumulation in the body and improving productive performance (Ji et al., 2007a, b), as was observed in this study.

In conclusion, juvenile Nile tilapia fed diets containing 1.2 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* showed higher activity of the digestive enzymes lipase and amylase, higher weight gain, specific growth rate, protein efficiency rate, higher deposition of hepatic glycogen, lower plasma glucose, lactate, triglycerides, LDL, ALT and LDH levels, in addition to better carcass quality. Therefore, it is recommended to use 1.2 g kg⁻¹ of essential oil of *M. piperita* in diets for juveniles of this species.

5. References

- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282-286.
- Adams, S. M., Ham, K. D., Greeley, M. S., LeHew, R. F., Hinton, D. E., & Saylor, C. F. (1996). Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(10), 2177-2187.
- Adel, M., Amiri, A. A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., & Esteban, M. Á. (2015a). Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 841-847.
- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Ghiasi, M. (2016). Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 267-273.
- Adel, M., Safari, R., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., & Esteban, M. Á. (2015b). Dietary peppermint (*Mentha piperita*) extracts promote growth performance and increase the main humoral immune parameters (both at the mucosal and systemic levels) of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), 623-629.
- Aanyu, M., Betancor, M. B., & Monroig, O. (2018). Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 488, 217-226.
- AOAC. (2016). Association of official analytical chemists. official methods of analysis of AOAC international.
- Bhosale, S. V., Bhilave, M. P., & Nadaf, S. B. (2010). Formulation of fish feed using ingredients from plant sources. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 1(3), 284-287.
- 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.
- Caraway, W. T. (1959). A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*, 32, 97-99.
- Carroll, N. V., Longley, R. W., & Roe, J. H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 220(2), 583-593.
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1-19.

Cherry, I. S., & Crandall Jr, L. A. (1932). The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 100(2), 266-273.

Chung, M. J., Cho, S. Y., Bhuiyan, M. J. H., Kim, K. H., & Lee, S. J. (2010). Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose-and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *British Journal of Nutrition*, 104(2), 180-188.

Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.

De Souza Silva, L. T., de Pádua Pereira, U., de Oliveira, H. M., Brasil, E. M., Pereira, S. A., Chagas, E. C., Jesus, G. F. A., Cardoso, L. Mouriño, J. L. P. & Martins, M. L. (2019). Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 506, 205-211.

De Souza, E. M., de Souza, R. C., Melo, J. F., da Costa, M. M., de Souza, A. M., & Copatti, C. E. (2019). Evaluation of the effects of *Ocimum basilicum* essential oil in Nile tilapia diet: growth, biochemical, intestinal enzymes, haematology, lysozyme and antimicrobial challenges. *Aquaculture*, 504, 7-12.

El-Dakar, A. Y., Shalaby, S. M., Nemetallah, B. R., Saleh, N. E., Sakr, E. M., & Toutou, M. M. (2015). Possibility of using basil (*Ocimum basilicum*) supplementation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 203-210.

El-Haroun, E. R., Goda, A. S., & Kabir Chowdhury, M. A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(14), 1473-1480.

Emerson, K., Russo, R. C., Lund, R. E., & Thurston, R. V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(12), 2379-2383.

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

Ferreira, P. D. M. F., da Silva Nascimento, L., Dias, D. C., da Veiga Moreira, D. M., Salaro, A. L., de 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*, 1(45), 28-34.

Freire, M. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., Jardim, C. M., Barcelos, R. C., & Valente, V. M. M. (2012). Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. *Journal of Food Safety*, 32(1), 29-36.

Furuya, W. M. (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. *Toledo: GFM*, 100.

Gomes, L. C. (2007). Physiological responses of pirarucu (*Arapaima gigas*) to acute handling stress. *Acta Amazonica*, 37(4), 629-633.

Gichuru, N. N., Manyala, J. O., & Raburu, P. O. (2019). Some aspects of reproduction and feeding habits of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in three dams in Uasin Gishu County, Kenya. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 24(2), 181-189.

Hsieh, S. L., & Shiau, S. Y. (2000). Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Fisheries Science*, 66(1), 32-37.

Hrubec, T. C., Cardinale, J. L., & Smith, S. A. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary clinical pathology*, 29(1), 7-12.

Ighwela, K. A., Ahmad, A. B., & Abol-Munafi, A. B. (2014). The selection of viscerosomatic and hepatosomatic indices for the measurement and analysis of *Oreochromis niloticus* condition fed with varying dietary maltose levels. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 1(3), 18-20.

İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943-3946.

Ji, S. C., Jeong, G. S., Gwang-Soon, I. M., Lee, S. W., Yoo, J. H., & Takii, K. (2007a). Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization, and stress recovery of Japanese flounder. *Fisheries Science*, 73(1), 70-76.

Ji, S. C., Takaoka, O., Jeong, G. S., Lee, S. W., Ishimaru, K., Seoka, M., & Takii, K. (2007b). Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 73(1), 63-69.

Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M. & Ivanišová, E. (2017). The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(8), 1108-1116.

Kamel, C. (2001). Natural plant extracts: Classical remedies bring modern animal production solutions. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 54(3), 31-38.

Kiferle, C., Ascrizzi, R., Martinelli, M., Gonzali, S., Mariotti, L., Pistelli, L., Flamini, G. & Perata, P. (2019). Effect of Iodine treatments on *Ocimum basilicum* L.: Biofortification, phenolics production and essential oil composition. *Plos One*, 14(12), e0226559.

Liu, Y. T., Wang, F., Wang, G. X., Han, J., Wang, Y., & Wang, Y. H. (2010). In vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Radix angelicae pubescentis*, *Fructus bruceae*, *Caulis spatholobi*, *Semen aesculi*, and *Semen pharbitidis* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 106(5), 1233-1239.

Ljubojević, D. B. (2017). Antibiotic Resistance in Fish. *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*, 102-132.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(8), 619-633.

Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., & Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*, 69(05), 413-419.

Moradabadi, L., Kouhsari, S. M., & Sani, M. F. (2013). Hypoglycemic effects of three medicinal plants in experimental diabetes: Inhibition of rat intestinal α -glucosidase and enhanced pancreatic Insulin and cardiac Glut-4 mRNAs expression. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 12 (3), 387-397.

Naik, R. S., Mujumdar, A. M., & Ghaskadbi, S. (2004). Protection of liver cells from ethanol cytotoxicity by curcumin in liver slice culture in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(1), 31-37.

Ozdemir, N., Ozgen, Y., Kiralan, M., Bayrak, A., Arslan, N., & Ramadan, M. F. (2018). Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* L. and *Origanum onites* L. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12 (2), 820-825.

Pretto, A., Loro, V. L., Morsch, V. M., Moraes, B. S., Menezes, C., Santi, A., & Toni, C. (2014). Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 188-192.

Reda, R. M., Ibrahim, R. E., Ahmed, E. N. G., & El-Bouhy, Z. M. (2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(4), 241-248.

Ribeiro, S. C., Malheiros, D. F., Guilozi, I. C., Majolo, C., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., De Assis, H. C. S., Tavares-Dias, M. & Yoshioka, E. T. O. (2018). Antioxidants effects and resistance against pathogens of *Colossoma macropomum* (Serassalmidae) fed *Mentha piperita* essential oil. *Aquaculture*, 490, 29-34.

Saccol, E. M. H., Uczay, J., Pês, T. S., Finamor, I. A., Ourique, G. M., Riffel, A. P. K., Schmidt, D; Caron, B. O.; Heinzmann, B. M.; Llesuy, S. F., Lazzari, R., Baldisserotto, B. & Pavanato, M. A. (2013). Addition of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, 416, 244-254.

Santos, J. F., Assis, C. R. D., Soares, K. L. S., Rafael, R. E. Q., Oliveira, V. M., de Vasconcelos Filho, J. E., França R. E. Q., Lemos, D. & Bezerra, R. S. (2019). A comparative study on Nile tilapia under different culture systems: Effect on the growth parameters and proposition of new growth models. *Aquaculture*, 503, 128-138.

Santos, L., & Ramos, F. (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 16-30.

- Shalaby, A. M., Khattab, Y. A., & Abdel Rahman, A. M. (2006). Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12(2), 172-201.
- Sharathchandra, J. N. N., Kalpana, P., & Srinivasan, K. (1995). Digestive enzymes of rat pancreas and small intestine in response to orally administered mint (*Mentha spicata*) leaf and garlic (*Allium sativum*) oil. *Indian Journal of Pharmacology*, 27, 156-60.
- Singh, R., Shushni, M. A., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3), 322-328.
- Sosa, B. D. S., Moro, E. B., Gomes, R. L. M., Cardoso, M. D. S., Cardoso, L. M., Boscolo, W. R., Oliveira, J. D. S. D., Signor, A & Bittencourt, F. (2020). Essential oils in diets for Nile tilapia juveniles: Productive performance and plasmatic biochemistry. *Aquaculture Research*, 00, 1-8.
- Souza, C. D. F., Baldissera, M. D., Salbego, J., Lopes, J. M., Vaucher, R. D. A., Mourão, R. H. V., Caron, B. O., Heinzmann, B. M., Silva, L. V. F. D. & Baldisserotto, B. (2017). Physiological responses of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) to anesthesia with essential oils from two different chemotypes of *Lippia alba*. *Neotropical Ichthyology*, 15(1), e160083.
- Srinivasan, K. (2005). Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Research International*, 38(1), 77-86.
- Sutili, F. J., Gatlin III, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716-726.
- Talpur, A. D. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 420, 71-78.
- Tomarelli, R. M., Charney, J., & Harding, M. L. (1949). The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 34(3), 428-433.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., Zhang, Q., & Wang, G. (2013). Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitology Research*, 112(8), 2839-2845.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pala, G., Jesus, R. B., Kotzent, S., Costa, J. C., Silva, T. F. A. & Pilarski, F. (2017). Practical diets with essential oils of plants activate the complement system and alter the intestinal morphology of Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 48(11), 5640-5649.
- Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., & Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151.

Zeppenfeld, C. C., Hernández, D. R., Santinón, J. J., Heinzmann, B. M., Da Cunha, M. A., Schmidt, D., & Baldisserotto, B. (2016). Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 933-940.

Zhang, R., Wang, X. W., Liu, L. L., Cao, Y. C., & Zhu, H. (2020). Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 518, 734-781.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a necessidade de encontrar um substituto viável para os antibióticos utilizados como promotores de crescimento e a exigência para o aumento da produtividade, aliado ao bem-estar dos peixes com a redução de impactos ao meio ambiente. É evidente a importância da utilização de produtos naturais, como o óleo essencial de hortelã-pimenta, na piscicultura. Com base nos resultados desse estudo é possível fazer as seguintes considerações:

- A utilização do nível de 1,20 g kg⁻¹ de OEP como promotor de crescimento para juvenis de tilápia-do-Nilo pode reduzir o ciclo produtivo da fase inicial de produção, principalmente na criação em sistemas intensivos, onde os peixes estão mais sujeitos a condições estressantes devido ao manejo e maior presença do homem durante a criação;
- Estudos como esse em outras espécies de peixes podem proporcionar melhores resultados de desempenho produtivo, com melhorias sobre as enzimas digestivas e melhor qualidade de carcaça, bem como promover a utilização de óleo essencial de hortelã pimenta em dietas comerciais para peixes;