

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÓLEO DE LINHAÇA E ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE  
CRAVO NA ALIMENTAÇÃO DE ZEBRAFISH

Autor: Thiberio Carvalho da Silva  
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Maringá  
Estado do Paraná  
junho - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÓLEO DE LINHAÇA E ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE  
CRAVO NA ALIMENTAÇÃO DE ZEBRAFISH

Autor: Thiberio Carvalho da Silva  
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração: Produção Animal.

Maringá  
Estado do Paraná  
junho – 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Silva, Thiberio Carvalho da  
S586o

Óleo de linhaça e óleo essencial da folha de cravo na ALIMENTAÇÃO DE Zebrafish. -- Maringá, 2017.

61 f. : il. color. , figs. , tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

1. Produção animal. 2. Nutrição de peixes. 3. Antioxidante. 4. Ácido graxo. 5. *Danio rerio*. 6. Estresse oxidativo. 7. Expressão gênica. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ED.639.3  
JLM000758



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ÓLEO DE LINHAÇA E ÓLEO ESSENCIAL  
DA FOLHA DE CRAVO NA ALIMENTAÇÃO  
DE ZEBRAFISH**

Autor: Thibério Carvalho da Silva  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADO em 27 de junho de 2017.

Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Prof. Dr. Eliane Gasparino

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de  
Oliveira

Prof. Dr. Fabio Bittencourt

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

“Esta parte da minha vida, esta pequena parte, se chama Felicidade”

(À Procura da Felicidade)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser essencial em minha vida, criador do meu destino, socorro presente na hora da angústia;

Ao meu pai, Amarildo J. Silva e minha mãe, Tania R. R. Carvalho, por todas as formas de apoio incondicional;

À minha namorada, Joana D'arc Rocha, por todo carinho e compreensão: eu te amo;

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) e ao Departamento de Zootecnia (DZO);

À CAPES, pelo auxílio da bolsa;

Ao professor e orientador, Ricardo Ribeiro, pela confiança em meu trabalho;

Aos professores, Jesui Vergílio Visentainer e Eliane Gasparino, fundamentais para a concretização do trabalho;

Ao professor e amigo, Dr. Wilson Rogério Boscolo, por todos os conselhos, credibilidade e reconhecimento, exemplo profissional e pessoal.

Aos colegas Karina Sayuri, Fabiana Carbonera, Michele Silva e Pedro Castro, pelo apoio crucial para a realização das análises laboratorias;

Ao grupo de pesquisa PeixeGEN - Manejo, Melhoramento e Genética Molecular em Piscicultura de Água Doce, que possibilitou o amadurecimento profissional e pessoal.

Muito obrigado.

## BIOGRAFIA

Thiberio Carvalho da Silva, filho de Amarildo J. Silva e Tania R. Carvalho, nasceu em Macapá – AP, no dia 29 de março de 1988.

Em março de 2007, ingressou no curso de graduação em Engenharia de Pesca da Universidade do Estado do Amapá. Em dezembro de 2011, concluiu a graduação.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação nível mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *campus* Toledo, obtendo, em fevereiro de 2014, o grau de Mestre.

Em março de 2014, iniciou no curso de Pós-Graduação, nível Doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Na data atual, submete-se à banca para defesa da tese de doutorado e obtenção do título de Doutor em Zootecnia, com área de concentração em Produção Animal pela Universidade Estadual de Maringá – UEM.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1 Zebrafish – Características Gerais .....	9
2.2 Zebrafish – modelo animal para pesquisa na área da aquicultura.....	11
2.3 Lipídeos e ácidos graxos .....	12
2.4 Metabolismo de lipídeos .....	14
2.5 $\beta$ -oxidação ácidos graxos .....	15
2.6 Peroxidação lipídica .....	16
2.7 Óleo de linhaça.....	16
2.8 Radicais livres e antioxidantes .....	17
2.9 Óleos essenciais .....	20
2.10 Referências bibliográficas .....	23
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
4. CAPITULO I.....	36
Óleo de linhaça e óleo essencial da folha de cravo em dietas para zebrafish.....	36
Resumo - .....	36
Introdução .....	37
Resultados.....	38
• Determinação da capacidade antioxidante das dietas .....	38
• Desempenho produtivo .....	38
• Incorporação dos ácidos graxos no músculo de zebrafish.....	40



• Avaliação da atividade antioxidante e nível de peroxidação .....	43
• Análise de expressão gênica .....	45
Discussão .....	46
Conclusão.....	51
Material e Métodos .....	51
• Dietas experimentais e manejo alimentar .....	51
• Peixes e condições experimentais.....	53
• Desempenho produtivo .....	54
• Determinação in vitro da atividade antioxidante das dietas experimentais .....	54
• Composição dos ácidos graxos na deita e músculo de zebrafish.....	54
• Avaliação da atividade antioxidante e peroxidação lipídica.....	54
• Análises de expressão gênica.....	55
• Análise estatística .....	56
Referências.....	56

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

#### Óleo de linhaça e óleo essencial da folha de cravo na alimentação de zebrafish

Tabela 1: Efeito do óleo de linhaça e e óleo essencial da folha de cravo sobre a capacidade antioxidante das dietas analisados através do ensaio de DPPH. ....	38
Tabela 2: Efeito isolado para as características de crescimento de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC). ....	39
Tabela 3: Efeito de interação para as características de crescimento de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dietas experimentais, contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC). ....	40
Tabela 4: Efeito isolado para o perfil de ácidos graxos (% do total) no músculo de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dieta contendo óleo de linhaça (OL) e o óleo essencial da folha de cravo (OEFC). ....	41
Tabela 5: Efeito isolado para o perfil de ácidos graxos (% do total) no músculo de zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dieta contendo óleo de linhaça (OL) e o óleo essencial da folha de cravo (OEFC). ....	43
Tabela 6: Efeito isolado dos marcadores antioxidantes e peroxidação lipídica (TBARS) avaliados em zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dietas experimentais, contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).....	44
Tabela 7: Efeito de interação da Glutaciona avaliados em zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dietas experimentais, contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC). ....	45
Tabela 8: Expressão gênica avaliados em zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).....	45
Tabela 9: Composição percentual das dietas experimentais.....	52
Tabela 10: Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais (% do total ácidos graxos). ....	53
Tabela 11: Primers utilizados neste estudo.....	56

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

- Figura 1: Ilustração de zebrafish (*Danio rerio*) macho (A) e fêmea (B). Fonte: (Avdesh et al., 2012). ..... 10
- Figura 2: Via da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados a partir dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) e linoleico (18:2n-6). As setas contínuas indicam a rota de síntese do EPA, DHA e ARA. As setas tracejadas sinalizam as possíveis rotas alternativas (Castro et al., 2012). ..... 13

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do óleo de linhaça (OL) e do óleo essencial da folha de cravo (OEFC) na alimentação de zebrafish, sobre atividade antioxidante das dietas, o crescimento dos animais, incorporação de ácidos graxos no músculo, marcadores de antioxidantes *in vivo*, peroxidação lipídica e expressão dos genes relacionados com a biossíntese do colesterol e  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. Foram elaboradas seis dietas extrusadas isoprotéicas (45% proteína) e isocalóricas (3.969 kcal kg<sup>-1</sup>), contendo a combinação de três níveis de OL (3, 6 e 9%) com dois níveis do OEFC (0,5 e 1%), além de uma dieta controle (ausente do OL e OEFC). Foram utilizados 420 zebrafish (*Danio rerio*) com idade de 40 dias após a eclosão e peso médio de  $0,29 \pm 0,04$  g e  $30,67 \pm 0,71$  mm de comprimento total. Os animais foram distribuídos em tanques de vidro com capacidade de 50 litros. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em esquema fatorial 3x2 com um tratamento adicional. As dietas contendo 1% do OEFC apresentaram maiores atividades antioxidantes ( $p < 0,05$ ), com um aumento médio de 270% em relação à dieta controle. Não houve mortalidade durante o período experimental. O peso final e ganho em peso aumentaram com a inclusão do OL (efeito isolado,  $p < 0,05$ ). A taxa de crescimento específico e comprimento final mostraram efeito de interação, com melhores resultados com a combinação de 0,5% do OEFC com 6 ou 9% do OL. A respeito do perfil de ácidos graxos no músculo, não houve diferença na somatória dos ácidos graxos saturados. No entanto, a somatória dos ácidos graxos monoinsaturados aumentou com os níveis do OL (efeito isolado  $p < 0,05$ ) e os ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 aumentaram com os níveis do OL e OEFC (efeito de interação  $p < 0,05$ ). A atividade do superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT) reduziram com efeito isolado para OL e para ambos os fatores, respectivamente. O conteúdo da glutathiona foi menor no tratamento com 0,5% do OEFC em combinação com OL. A peroxidação lipídica foi menor no tratamento com 0,5% do OEFC (efeito isolado,  $p < 0,05$ ). Os genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-2 mostraram efeito de interação ( $p < 0,05$ ) e ambos apontaram o mesmo

comportamento. Os tratamentos com 9 e 0,5% de OL e OEFC foram superiores aos demais. Recomenda-se uso combinado de 9% do OL com 0,5% do OEFC para zebrafish.

**Palavras-chave:** Antioxidante, ácido graxo, *Danio rerio*, estresse oxidativo, expressão gênica.

## ABSTRACT

Objective the present study was to evaluate the effects of linseed oil (LO) and clove leaf essential oil (CLEO) on zebrafish diet, on dietary antioxidant activity, growth, incorporation, in vivo antioxidant markers and gene expression. Six extruded diets were prepared, isonitrogenous (45% protein) e isocaloric (3969 kcal kg<sup>-1</sup>), containing the combination of three levels of linseed oil (3, 6 e 9%) with two levels (0.5 e 1%), beyond control diet (without OL and CLEO). A total of 420 zebrafish were used at the age of 40 days post hatching, with an average weight of  $0.29 \pm 0.04$  g. and  $30.67 \pm 0.71$  mm total length. Animals were distributed in glass tanks with a capacity of 50 liters. The experimental design was completely randomized with three replicates in a 3x2 factorial scheme with an additional treatment. Diets containing 1% of CLEO had higher antioxidant activity ( $p < 0.05$ ) with an average increase of 270% compared to control diet. There was no mortality during the experimental period. The final weight and weight gain increased with OL inclusion (isolated effect,  $p < 0.05$ ). Regarding the fatty acid profile in muscle, there was no difference in the sum of saturated fatty acids. Monounsaturated fatty acids increased with OL levels (isolated effect,  $p < 0.05$ ) and polyunsaturated fatty acids of the n-3 series increased with OL and OEFC levels (interaction effect  $p < 0.05$ ). Activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) reduced with isolated effect for OL and for both factors, respectively. The content of glutathione was lower in the 0.5% OEFC treatment in combination with OL. Lipid peroxidation was lower in the 0.5% OEFC treatment (isolated effect,  $p < 0.05$ ). PPAR- $\alpha$  and SREBP-2 genes showed interaction between the factors ( $p < 0.05$ ) and both showed the same behavior. The treatments with 9 and 0.5% of OL and OEFC were superior to the others. It is recommended to use combined 9% of OL with 0.5% of OEFC for zebrafish.

**Key words:** Antioxidant, fatty acid, Danio rerio, oxidative stress, genetic expression.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os óleos são importantes fontes de lipídeos na nutrição de peixes, sendo fonte de energia de alta densidade e fonte de ácidos graxos essenciais (NRC, 2011). Estes compostos atuam em diversas funções celulares, pois são importantes como componentes estruturais das membranas celulares e como moléculas sinalizadoras (Mourente et al., 2007).

O óleo de linhaça se destaca dos demais óleos vegetais por ser a fonte mais rica em ácido graxo poliinsaturado  $\alpha$ -linolênico (Popa et al., 2012), precursor de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), que são fisiologicamente importantes para o organismo (Nayak et al., 2017).

Esses elementos são susceptíveis ao ataque de radicais livres, levando-o à peroxidação lipídica, acarretando danos celulares severos (Ayala et al., 2014). No entanto, a adição de antioxidantes em óleos vegetais pode reduzir esses efeitos (Aramovic et al., 2007). Sob essa perspectiva, o óleo essencial da folha de cravo pode atuar como agente antioxidante na proteção destes ácidos graxos contra ação deletéria dos radicais livres. Recentemente, foi confirmada a forte atividade antioxidante do óleo essencial da folha de cravo, em virtude da presença de componentes biativos (Biondo et al., 2017).

Além de sua vital importância no desempenho nutricional, a composição de ácidos graxos em peixes tem recebido atenção, em função de suas implicações para a saúde humana (Souza et al., 2007). Os ácidos graxos da série n-3, especialmente o EPA e DHA são nutrientes cruciais para os seres humanos, pois são conhecidos os efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, artrite, diabete e entre outros (Etherton et al., 2003; Colon e Cole, 2007; Jangale et al., 2013).

O alto teor de ácido graxo da série n-6 na dieta favorece a elevada formação de eicosanoides inflamatórios que contribuem para formação de trombos e ateromas

(PERINI et al., 2010). A Organização Mundial da Saúde (2016) recomenda um consumo na proporção de 4:1 de n-6/n-3, sendo que o consumo médio atual é de 20:1.

Em virtude do aumento na produção aquícola, e conseqüentemente o crescente consumo de peixe oriundo desta atividade (FAO, 2016), torna-se importante o incremento dos ácidos graxos da série n-3 nestes animais, para que a qualidade nutricional da carne melhore, sem que haja prejuízo zootécnico do animal.

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo animal consolidado em diversas áreas de pesquisa, sendo utilizado em ensaios de biomedicina à toxicologia (Bergeron et al., 2008; Whipps et al., 2015) e nos últimos anos, vêm sendo considerado como modelo para investigação na aquicultura em estudos de nutrição, reprodução, bem-estar, entre outros (Ulloa et al., 2014; Ribas e Piferrer, 2014). No presente estudo, o zebrafish foi utilizado para avaliar os efeitos da combinação do óleo de linhaça e do óleo essencial da folha de cravo sobre o crescimento dos peixes, incorporação de ácidos graxos no músculo, estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. O resultado deste estudo poderá contribuir com informações relevantes tanto para a nutrição da espécie, quanto para a possibilidade de utilização de um novo alimento.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Zebrafish – Características Gerais

O zebrafish (*Danio rerio*) ou paulistinha é um peixe tropical de água doce, nativo da bacia dos rios Ganges e Brahmaputra, localizada no nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal, na região Sul do continente asiático (Spence et al., 2008). São comumente encontrados em corpos d'água com baixa profundidade, com cerca de 30 cm de visibilidade, com baixa movimentação e com vegetação aquática submersa e substrato lodoso (Spence et al., 2006; McClure et al., 2006; Engeszer et al., 2007).

Possui o corpo fusiforme e achatado lateralmente, com listras alternadas escuras e claras em toda a sua extensão longitudinal, motivo pelo qual é comumente chamado de zebrafish. Seu tamanho raramente ultrapassa os 5 cm de comprimento padrão (Spence et al., 2008). Os sexos podem ser distinguidos com base nas diferenças no tamanho corporal, forma e pigmentação. Estas diferenças podem ser difíceis de apreciar em peixes jovens, mas são fáceis de detectar quando os animais atingem a idade adulta. Os machos são, geralmente, menores e têm o corpo mais alongado com listras dourada e azul, enquanto as fêmeas são maiores, mais arredondadas, com barriga esbranquiçada, cores alternadas de prata e azul e exibem uma pequena papila genital na frente da nadadeira anal (Parichy et al., 2009) (Figura 1).



Figura 1: Ilustração de zebrafish (*Danio rerio*) macho (A) e fêmea (B). Fonte: (Avdesh et al., 2012).

É uma espécie onívora, onde sua dieta consiste principalmente de insetos aquáticos, zoo e fitoplâncton, bem como material inorgânico. Isto indica que estes animais se alimentam ao longo da coluna de água (Dutta, 1993; McClure et al., 2006; Spencer et al., 2007). Com relação ao trato digestório, o zebrafish, não apresenta estômago, sendo que o esôfago se diferencia em intestino, formando um tubo longo inicialmente largo e progressivamente mais estreito na direção rostral/caudal (Menke et al., 2011).

Do ponto de vista reprodutivo, é uma espécie assíncrona, desova em pequenos grupos. O momento em que os indivíduos atingem a maturidade sexual parece estar mais relacionado com o tamanho do que com a idade. Spence et al. (2008) afirmam que animais selvagens e de laboratório parecem alcançar a maturidade sexual com tamanhos semelhantes (23 mm de comprimento padrão), apesar das taxas de crescimento divergentes. As fêmeas liberam os ovos no substrato e estes são fertilizados por espermatozoides dos machos, e a eclosão ocorre entre 4 a 7 dias (Lawrence, 2007). Em um estudo realizado por Spence e Smith (2006), foi observado que os intervalos de desova variaram de 1 a 6 dias, produzindo cerca de 200 ovos por desova, onde este número apresenta uma correlação positiva com o tamanho da fêmea e intervalo de desova.

O ciclo de vida pode ser dividido com base no comprimento padrão do corpo (CP) e nos dias pós-fertilização (dpf), em três fases distintas (Singleman e Holtzman, 2014). A fase larval dura cerca de 6 semanas (3 a 12 mm CP), começando no terceiro dpf, e é caracterizada por um crescimento exponencial. Em torno de 45 dpf, os indivíduos entram na fase juvenil (12-18 mm CP), passam por alterações morfológicas,

como a perda completa da dobra da nadadeira larval (Parichy et al., 2009). Finalmente, o adulto/estágio de pós-juvenil ocorre em torno do 3º mês (90 dpf, com tamanho acima de 18 mm CP), em que a taxa de crescimento diminui e os indivíduos atingem a maturidade sexual e tornam-se capazes de reproduzir (Singleman e Holtzman, 2014).

## **2.2 Zebrafish – modelo animal para pesquisa na área da aquicultura**

O zebrafish atualmente é um dos modelos biológicos mais utilizados em estudos nas áreas de desenvolvimento embrionário, biomédica e genética molecular (Bergeron et al., 2008; Whipps et al., 2015). O sucesso desta espécie como modelo animal se deve a fatores como facilidade de manejo, alta produção de ovos (100-200 ovos/desova), desenvolvimento externo, transparência dos embriões e rápido crescimento (Sumanas e Lins, 2004; Silveira et al., 2012). Além disso, o genoma do zebrafish indica que 71% de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos (Howe et al., 2013).

A utilização dessa espécie como modelo experimental para melhorar o processo de produção aquícola tem emergido como um campo de pesquisa importante (Ulloa et al., 2011 ; Ribas e Piferrer de 2014), podendo ser aproveitado numa gama de áreas de pesquisa direcionadas à nutrição, reprodução, doenças, toxicologia e estresse (Dahm e Geisler, 2006, Oyarbide et al., 2012 ; Hedrera et al., 2013; Ulloa et al., 2013 ).

No campo da nutrição, a avaliação de um grande número de dietas resulta em custos elevados e ensaios a longo prazo, e, por esta razão torna-se necessário implementar novas estratégias, a fim de acelerar e tornar rentável este processo experimental (Ulloa et al., 2014). Ao utilizar o zebrafish como modelo experimental, estas dificuldades podem ser resolvidas, pois um grande número de fatores dietéticos pode ser analisado em menor tempo com custos mais baixos e o seu efeito estudado com mais eficácia em nível molecular (Dahm e Geisler, 2006), pois seu genoma sequenciado, permite a utilização eficiente de novas tecnologias, como as plataformas de sequenciamento de RNA e genotipagem, para estudar os mecanismos moleculares subjacentes à resposta do organismo aos nutrientes (Ulloa et al., 2014).

Embora o zebrafish possua potencial em estudos nutricionais, é importante ressaltar que ensaios neste peixe não podem substituir a análise nas espécies de interesse. O processo biológico e os mecanismos moleculares subjacentes à resposta do crescimento aos nutrientes se sobrepõem entre diferentes peixes, independentemente da

distância evolutiva ou das condições ambientais. Compreender como as cascatas de sinalização são coordenadas e seus efeitos sobre a resposta fisiológica, como crescimento e inflamação, podem ser desvendados no zebrafish. Assim, as investigações realizadas na nutrição do zebrafish poderiam trazer contribuições importantes para as pesquisas direcionadas para nutrição de peixes (Ulloa et al., 2013; Ulloa et al., 2014).

### 2.3 Lipídeos e ácidos graxos

Os lipídeos são definidos como conjunto complexo de substâncias químicas caracterizadas pela sua solubilidade em solventes orgânicos apolares e baixa solubilidade em solventes polares (Sargent et al., 2002). São importantes para o crescimento normal e desenvolvimento dos peixes, pois são fonte de energia, elementos estruturais de membranas celulares, auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis e esteróis, componentes de hormônios, mensageiro intracelular e entre outros (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003).

Os ácidos graxos são a classe mais simples de lipídeos formadas por cadeias hidrocarbonadas de comprimento, variando de 4 a 36 carbonos e podem ser classificados de acordo com sua saturação, caracterizada pelo número de ligações simples ou duplas. Quando os ácidos graxos apresentam apenas ligações simples, são denominados saturados – *Saturated Fatty Acid* (SAFA). Quando há uma dupla ligação, estes são classificados como monoinsaturados – *Monounsaturated Fatty Acid* (MUFA) e na presença de duas ou mais instaurações são denominados poliinsaturados – *Poliunsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Raposo, 2010; Nelson e Cox, 2014).

Assim como os demais vertebrados, os peixes não podem realizar a síntese dos PUFAs da série-3 (ácido  $\alpha$ -linolênico, 18:3n-3) e da série-6 (ácido linoleico, 18:2n-6) por não possuírem enzima desaturase específicas tornando-o ácidos graxos essenciais e, portanto, eles devem ser obtidos da dieta para evitar deficiências nutricionais (Teitelbaum e Walker, 2001; Trattner, 2009).

O ácido graxo linoleico e  $\alpha$ -linolênico são essenciais para funções celulares normais, e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos PUFA de cadeia longa como os ácidos araquidônico (ARA, 20:4n-6), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenoico (DHA, 22:6n-6), que fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana,

interações lipídeo-proteína e síntese de eicosanoides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Youdim et al., 2000).

Ao contrário dos peixes de ambiente marinho, os peixes de água doce possuem a capacidade de converter o ácido linoleico à ARA e o  $\alpha$ -linolênico à EPA e DHA através de uma série de enzimas de alongamento e dessaturação (Figura 1). Este fato se deve à adaptação da espécie ao ambiente, visto que os peixes marinhos possuem uma dieta natural formada por alimentos ricos em EPA e DHA, o que resultou em perda na capacidade de alongação e dessaturação. Porém, os peixes de água doce, geralmente, possuem as duas enzimas  $\Delta 6$  e  $\Delta 5$  dessaturases, capazes de modificar um determinado ácido graxo em seu correspondente de cadeia mais longa (Zeng et al., 2004; Garcia et al., 2013; Sargent, 2002).

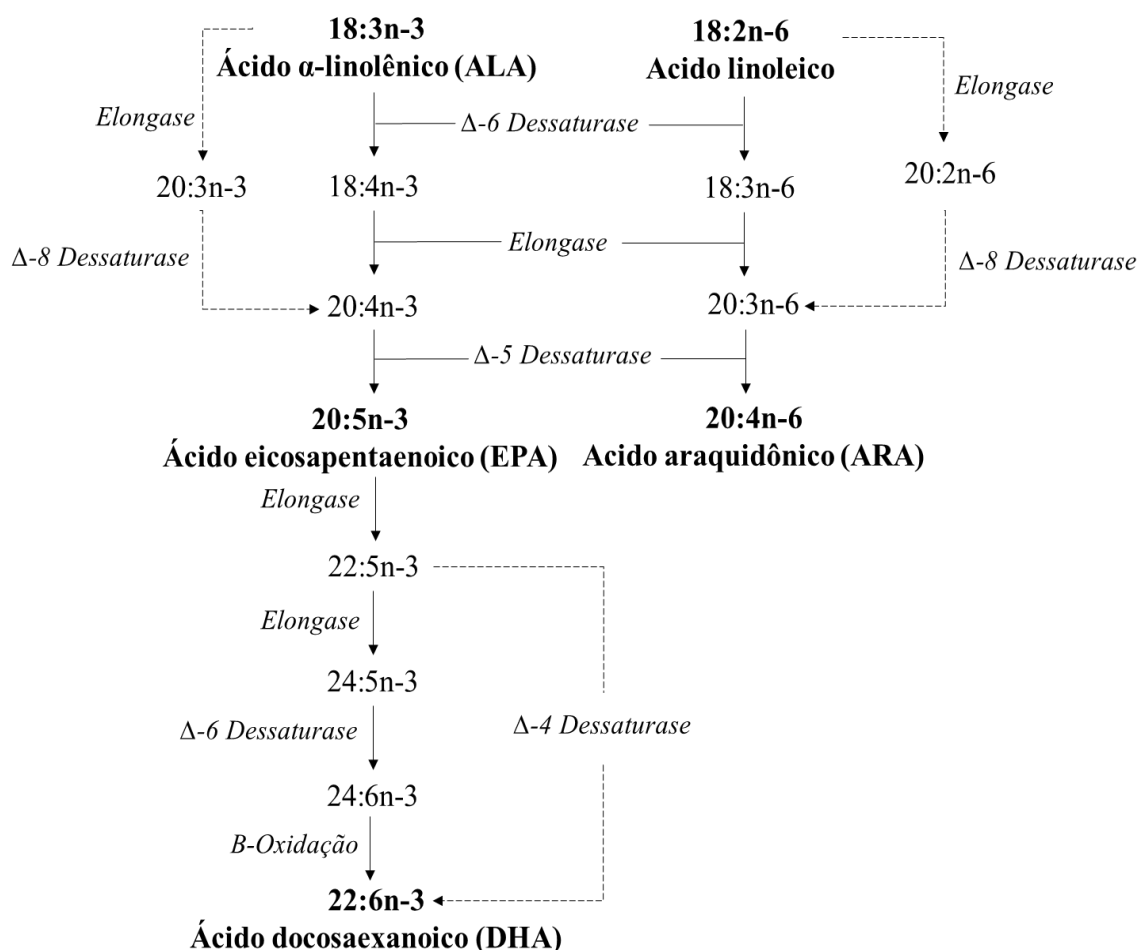


Figura 2: Via da biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados a partir dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) e linoleico (18:2n-6). As setas contínuas indicam a rota de síntese do EPA, DHA e ARA. As setas tracejadas sinalizam as possíveis rotas alternativas (Castro et al., 2012).

## 2.4 Metabolismo de lipídeos

O processo de digestão, absorção e transporte dos lipídeos em peixes é similar aos mamíferos (Holtta-Vuori et al., 2010). A digestão lipídica ocorre principalmente na região proximal do intestino. Os lipídios ingeridos passam por uma hidrólise extracelular realizados por lipases no lúmen intestinal para liberar ácidos graxos que são absorvidos na parede em escova dos enterócitos, enquanto que os ácidos graxos maiores que 12 carbonos e monoglicerídeos são clivados e emulsionados por sais biliares para formar a micela, que são transportados do lúmen para a borda da escova, onde é dissociada a ácido graxo e difundida através da membrana epitelial. Dentro dos enterócitos ocorre a reesterificação dos triglicerídios a partir dos ácidos graxos de cadeia longa e monoglicerídeos, que são organizados com o colesterol da dieta e proteínas específicas para formar agregados de lipoproteínas chamados quilomícrons que se difundem para o sangue transportando as gorduras no organismo (Rotta, 2003; Nelson e Cox, 2014, Tocher e Glencross, 2015).

Os quilomícrons remanescentes movem-se pela corrente sanguínea até o fígado onde são degradados por  $\beta$ -oxidação na mitocôndria ou reincorporados em triacilglicerol (TAG) quando a dieta contém mais ácidos graxos e colesterol do que a quantidade necessária para o uso imediato. Nesta situação, o TAG associa-se à apolipoproteínas específicas, formando as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). As VLDL são transportadas pelo sangue do fígado para o músculo e tecido adiposo, onde são liberados os ácidos graxos e reconvertidos em triacilgliceróis por adipócitos e armazenam em gotículas lipídicas intracelulares e os miócitos oxidam esses ácidos graxos para geração de energia (Tocher, 2003; Nelson e Cox, 2014, Tocher e Glencross, 2015).

A remoção dos lipídeos da VLDL (acompanhada pela perda de parte das apolipoproteínas) converte, gradualmente, uma porção da VLDL em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos ou de volta para o fígado. O fígado capta LDL, restante da VLDL e os remanescentes de quilomícrons por endocitose mediada por receptor. O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado de volta ao fígado como lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Trattner, 2009; Nelson e Cox, 2014, Tocher e Glencross, 2015).

O excesso de lipídeo na dieta em peixes é tipicamente depositado em células/tecido adiposo, embora o local exato no corpo varia de acordo com as espécies, geralmente o acúmulo ocorre na região intraperitoneal. Em salmão e arenque o excesso de lipídeos é depositado no músculo e, no bacalhau, o armazenamento é predominantemente no fígado (Tocher e Glencross, 2015).

## 2.5 $\beta$ -oxidação ácidos graxos

Considerando que a biossíntese de ácidos graxos acontece no citosol, o catabolismo oxidativo, que é a principal fonte de energia em muitas espécies de peixes, ocorre nas mitocôndrias e nos peroxissomos, processo denominado de  $\beta$ -oxidação (Tocher e Glencross, 2015).

Como o acetil-CoA é o substrato básico para a  $\beta$ -oxidação, as células devem primeiramente converter o ácido graxo em seus ésteres de CoA, usando acetil-CoA-sintase. Os ácidos graxos transportados para a mitocôndria na forma de acetil-carnitina, formados através da enzima carnitina-palmitoil-transferase-1 (CPT-1), são convertidos novamente em acetil-graxo-CoA. Esse complexo esquema de transporte fornece um nível de controle adicional sobre a oxidação dos ácidos graxos. Regulando a atividade da CPT-1, as células controlam a quantidade de ácido graxo que pode ingressar na mitocôndria ou peroxissomos para o catabolismo (Moyes e Schulte, 2010).

Dentro da organela, os ácidos graxos na forma de acetil-graxo-CoA ingressam na via da  $\beta$ -oxidação, onde passam por sequência cíclica de clivagem para liberação de moléculas acetil-CoA. Em cada ciclo, são produzidos acetil-CoA e NADH, que serve então como um doador de elétrons para a cadeia de transporte, conduzindo a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa (Tocher e Glencross, 2015).

As taxas relativas de oxidação dos ácidos graxos mostram as seguintes ordens de preferência: saturado/monoinsaturado > PUFA > LC-PUFA, sendo que os ácidos graxos da série n-6 são usados prioritariamente em relação à série n-3, em virtude de especificidade enzimática (Tocher e Glencross, 2015).

## 2.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica consiste em uma reação em cadeia na qual oxidantes (radicais livres) causam a quebra dos fosfolipídios de membrana que contêm ácidos graxos poliinsaturados e quanto maior o grau de insaturação, mais susceptível a ação nociva dos radicais livres (Sargent e al., 2002).

Os danos da peroxidação lipídica tem sérias consequências para estrutura e fluidez da membrana celular com potenciais efeitos patológicos sobre as células e tecido, provocando efeitos negativos nos peixes, como redução de crescimento, perda de apetite, redução da eficiência alimentar e mortalidade (Sargent e al., 2002; Tocher e Glencross, 2015).

Um dos métodos mais utilizados para determinação da peroxidação lipídica em peixes é o ensaio conhecido como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que quantifica a formação de malondialdeído (MDA). O MDA é um dos produtos finais da peroxidação lipídica, que reage com o ácido tiobarbitúrico em pH ácido e temperaturas elevadas para formar um composto fluorescente de cor rosa, que pode ser quantificado em espectrofotômetro (Hermes-Lima, 2004).

Quando comparados a outros vertebrados, os peixes apresentam níveis de peroxidação lipídica semelhantes. Entretanto, esse processo pode apresentar variações dependendo do hábito alimentar da espécie, visto que a peroxidação lipídica tende a ser menor em peixes herbívoros do que nas espécies onívoras, correlacionando-se com a menor atividade de enzimas antioxidantes como catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Lackner, 1998).

## 2.7 Óleo de linhaça

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é obtida a partir do linho, uma herbácea pertencente à família das Lináceas, sendo uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem (Monego, 2009). Documentos históricos mostram que a semente de linhaça era utilizada para consumo e a planta do linho era empregada para tratar ferimentos (Credidio, 2005; Braga e Medonga, 2010).

A linhaça está a emergir como um importante ingrediente alimentar funcional, devido aos potenciais benefícios à saúde associados com alguns de seus componentes



biologicamente ativos, capazes de atuar sobre o organismo, promovendo melhorias no funcionamento digestivo, no controle da glicose e na redução de colesterol, além de apresentar ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Goyal et al., 2014). São fonte rica em ácido  $\alpha$ -linolênico, fibras solúveis e insolúveis, além de lignanas fitoestrogênicas (Ivanova et al., 2011; Singh et al., 2011; Alhassane e Xu, 2010).

A produção do óleo de linhaça é realizada por prensagem a frio seguida de extração por solvente orgânico (Hexano) para aumentar a recuperação do óleo (Bozan e Temelli, 2002). Dentre os óleos vegetais, o óleo de linhaça é uma das fontes mais ricas em ácido  $\alpha$ -linolênico, com aproximadamente 57% dos ácidos graxos totais e ainda estão presentes o ácido linoleico (16%), o ácido oleico (18%) e ácidos graxo saturados (9%) (Ganorkar et al., 2013) e possui uma excelente proporção de ácidos n-6/n-3 de aproximadamente 0,3:1 (Pellizzon et al., 2007).

Devida a essa composição, o óleo de linhaça apresenta grande potencial para o emprego na alimentação de organismos aquáticos por ser fonte importante de ácido  $\alpha$ -linolênico precursor de EPA e DHA, podendo proporcionar benefícios tanto para o desempenho animal, quanto para a saúde.

## 2.8 Radicais livres e antioxidantes

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular com existência independente que possui um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Esta configuração o torna instável e altamente reativo com a capacidade de doar ou receber elétrons de outras moléculas, portanto comportando-se como oxidante ou redutor (Halliwell e Gutteridge, 1999; Flora, 2009; Lobo et. al., 2010).

Os radicais livres são derivados de oxigênio e nitrogênio e estes radicais podem servir para a formação de outras espécies químicas que, embora não tenham elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência da sua instabilidade estrutural (Ribeiro, 2005). Por essa razão, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são o termo mais apropriado para designar espécies reativas na forma de radical livre ou não-radical (Ribeiro et al., 2008).

Assim, os ERO's abrangem os radicais de oxigênio como radical hidroxil ( $\bullet$ OH) e radical superóxido ( $O_2^-$ ), e os não-radicais, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio ( $O_3$ ) e oxigênio singlete ( $1O_2$ )<sup>2</sup> (Berra et al.,

2006). As ERN's incluem o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (Barreiros et al., 2006).

Os ERO's e outros radicais livres são produzidos continuamente a partir de processos metabólicos essenciais no organismo como resultado das reações de oxidação-redução ou por fontes externas (Karakaya et al., 2001; Lobo et al., 2010). As mitocôndrias são as maiores produtoras de radicais livres, sendo o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) comumente gerado, a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora das mitocôndrias. Outra fonte de radicais livres no organismo são as células do sistema imunológico, produtoras de enzimas NADPH Oxidase (Nox) que produzem uma grande quantidade de  $\text{O}_2^-$  capazes de matar microrganismos invasores (Magder, 2006; Hekimi et al., 2011; Lambeth e Neish, 2014).

Em condições fisiológicas normais, esses elementos são benéficos e indispensáveis, desempenhando um importante papel como mensageiros em vias de sinalização de insulina, hormônio de crescimento, citocinas e até mesmo controlar a expressão de alguns grupos de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial. Atuam também na fisiologia cerebral, nos sistemas imune, vascular e digestivo e produção de hormônios (Brown 2009; Sohal et al 2012; Hekimi et al., 2011; Lambeth e Neish 2014). Em contraste, o excesso de radicais livres promove efeitos deletérios ao organismo, atacando macromoléculas importantes que conduzem a danos celulares e perturbações da homeostase. Os alvos de radicais livres incluem todos os tipos de moléculas, entre eles, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (Flora, 2009; Lobo et al., 2010).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção e eliminação dos radicais livres, prejudicando o metabolismo e regulação celular, caracteriza-se o estresse oxidativo (Lushchak, 2014). Para evitar os danos causados pelos radicais, o organismo desenvolveu uma complexa rede de defesa composta por substâncias que agem para prevenir as ações oxidativas aos componentes celulares, denominados de antioxidantes (Sies, 1997; Vertuani et al., 2004).

Por definição, os antioxidantes são substâncias presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, o qual possui a capacidade de prevenir ou retardar a oxidação daquele substrato (Hallwell, 2007). Esses agentes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Urso e Clarkson, 2003). O sistema enzimático consiste na primeira via de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do radical superóxido e peróxido de hidrogênio, sendo representadas principalmente

pela enzima catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (Vasconcelos et al., 2007).

A CAT é uma hemoprotéina que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, sendo presente em todos os tecidos, podendo ser encontrada em grandes concentrações no fígado. A CAT encontra-se associada em grandes quantidades ao peroxissomo, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (Goth et al., 2004; Nelson e Cox, 2014). É um importante marcador de estresse oxidativo, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em condições fisiológicas inadequadas (Chandran et al., 2005; Avilez et al., 2008).

A enzima SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio. Representa, portanto, uma das mais importantes defesas antioxidantes enzimáticas existentes em praticamente todas as células expostas ao oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2005). Existem diferentes tipos de SOD que diferem quanto à estrutura, distribuição e metal ligados a ela. Nos peixes, assim como nos demais animais, existem duas formas que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD) presente no citoplasma e no espaço intermembranoso mitocondrial (Hermes-Lima, 2004).

A SOD apresenta grandes diferenças em atividades entre tecidos e espécies de peixes, sendo que sua maior atividade ocorre em peixes marinhos em comparação com peixes de água doce (Wilhelm-Filho, 1996). A respeito de ambientes contaminados, a atividade tende a ser maior em peixes de locais poluídos, sugerindo que sua atividade pode ser usada para medir a severidade do impacto ambiental (Van Der Oost et al., 2003).

A GPx é a principal peroxidase em peixes, sendo um importante biomarcador, pois demonstra resultados expressivos em diversas situações de estresse, por exemplo, o aumento acentuado na atividade da GPx em vários tecidos de carpa expostas a agrotóxicos (Stegeman et al., 1992; Cogo et al., 2009). Sua ação ocorre através da redução de diferentes peróxidos, como peróxido de oxigênio e hidroperóxidos de ácidos graxos, a água ou álcool (Halliwell, 2007). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (Hermes-Lima, 2004, Green et al., 2004)

Com relação ao sistema de defesa não enzimático, este pode ser agrupado em compostos produzidos *in vivo*, como glutathione (GSH) e ácido úrico, e também

compostos dietéticos, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. Entre os minerais, destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio (Prasad et al., 2007; Vasconcelos et al., 2007; Barbosa et al., 2010).

A GSH é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não protéico mais importante no sistema de defesa contra o estresse oxidativo, estando presente em altas concentrações no meio intracelular (Birben et al., 2012). A GSH mostra seus efeitos em diversos processos metabólicos como da detoxificação de xenobióticos, eliminação de produtos da lipoperoxidação, transporte de aminoácidos, atua como coenzima em várias reações enzimáticas e é requerida para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Macella et al., 2005; Park e You, 2010).

A vitamina C, é um eliminador de radicais livres solúvel em água. Além disso, regenera a vitamina E nas membranas celulares em combinação com GSH ou compostos capazes de doar redutores equivalentes (Nimse e Pal, 2015). A vitamina E lipossolúvel é concentrada no interior da membrana celular, no meio hidrofóbico, sendo a principal defesa contra a lesão da membrana induzida por oxidante. A vitamina E doa elétrons para o radical peroxil, que é produzido durante a peroxidação lipídica (Birben et al., 2012).

Os carotenóides desempenham um papel importante na proteção das membranas celulares e das lipoproteínas contra os radicais livres devido à sua atividade de eliminação do radical peroxil, gerados no processo de peroxidação lipídica que podem danificar os lipídeos na parede celular (Nimse e Pal, 2015).

## **2.9 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OE) são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor e são formados por plantas aromáticas, como resultado de processos metabólitos secundários (Bakkali et al., 2008). Os componentes presentes nestes óleos são divididos em dois grupos, onde o principal grupo é composto por terpenos e terpenóides e o outro por constituintes alifáticos e aromáticos de baixo peso molecular. As principais classes de terpenos são: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os terpenóides (terpenos oxigenados). Os compostos

aromáticos e alifáticos ocorrem com menor frequência, quando comparados aos terpenos. Estes são derivados do fenilpropano e incluem os aldeídos, alcoóis, fenóis, derivados metoxilados e derivados dioxi-metilenos (Bakkali et al., 2008; Carson e Hammer, 2011).

Os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes partes do vegetal, tais como folhas, flores, ramos, frutos, rizomas e raízes. Após sua biossíntese, são armazenados em células e dutos, canais e bolsas secretoras, além de tricomas e glândulas, sendo comumente extraídos através do método de destilação a vapor (Burt, 2004; Edris, 2007). A composição química do óleo pode variar, dentre outros fatores, conforme a espécie e partes de um mesmo vegetal (Miranda et al., 2016).

Recentemente, em virtude de suas propriedades antioxidantes, a maioria dos óleos essenciais tem sido reconhecida como poderosos antioxidantes com potencial substituto aos produtos sintéticos (Cansian et al., 2010). Frente a isso, as indústrias de alimentos têm empregado estes óleos ou compostos isolados para proteção oxidativa e deterioração lipídica, o que afeta diretamente a vida de prateleira de muitos produtos (Miranda et al., 2016). Ainda assim, a quantidade de óleos essenciais utilizadas foi determinante para a aceitação, pois aromas fortes de óleos essenciais podem ser transmitidos aos produtos alimentícios (Chouliara et al., 2007).

Além disso, os compostos antioxidantes presentes nos óleos essenciais, como taninos, compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas e entre outras (Gian et al., 2012; Govardhan-Singh et al., 2013;), desempenham um importante papel no sistema imunológico (Gökmen et al., 2009). Tais compostos podem atuar de diferentes modos, por eliminação de radicais livres ou evitando a decomposição de peróxidos, bem como pela complexação de íons metálicos com elevado poder de oxidação (Oliveira et al., 2009).

Neste sentido, o óleo de cravo (*Eugenia caryophyllus*) é um óleo essencial que contém uma variedade de compostos bioativos, sendo seu constituinte majoritário o eugenol (2-metoxi-4alifenol), que apresenta forte atividade antioxidante e antimicrobiana (Mulla et al., 2017). Teixeira et al. (2013) avaliaram a capacidade antioxidante de 17 óleos essenciais comerciais, dentre eles, o óleo de cravo, o qual revelou a maior atividade antioxidante. Recentemente, Biondo et al. (2017) relataram que os maiores valores de capacidade antioxidante foram encontrados nos óleos essenciais extraídos de especiarias de cravo, destacando o óleo essencial obtido a partir

das folhas, que apresentou resultados superiores de atividade antioxidante nos ensaios DPPH, ABTS e ORAC, no conjunto de 18 amostras de óleos.

Como aditivo alimentar, o eugenol foi classificado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA como uma substância considerada segura a níveis não superiores a 1500 ppm. Além disso, o comitê de especialistas em aditivos alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a ingestão humana diária aceitável de óleo de cravo em 2,5 mg Kg<sup>-1</sup> de peso corporal (Gülçin et al., 2012).

Nos últimos anos, vários estudos relatam resultados positivos na utilização de óleos essenciais como aditivos alimentares na nutrição animal. Esses produtos têm grande potencial para serem utilizados na aquicultura devido aos seus efeitos benéficos reconhecidos, tais como promoção do crescimento, estimulação do apetite, efeitos imunomoduladores e antioxidantes, bem como atividades antiparasitárias e antibacterianas (Sutili et al., 2017).

A suplementação dietética com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) foi útil para aumentar o crescimento, respostas imunes e resistência à doença em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Brum et al., 2017). O óleo essencial de alho (*Allium sativum*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*) foi capaz de melhorar a conversão alimentar e a taxa de eficiência proteica para esta mesma espécie (Hassaan e Soltan, 2016).

Nos últimos anos, o óleo essencial de cravo tem sido reconhecido como um anestésico eficaz para sedação de peixes em procedimentos invasivos ou não invasivos (Gülçin et al., 2012, Rodrigues et al., 2015). Apesar do seu potencial biológico, são raros os estudos com objetivo de avaliá-lo como aditivo alimentar. Os óleos essenciais extraídos da canela (*Cinnamomum verum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), gengibre (*Zingiber officinale*) e manjeriço (*Ocimum sanctum*) foram adicionados em dietas para tilápias do Nilo e investigados quanto a sua atividade antimicrobiana e modo de ação contra infecção de *Lactococcus garvieae*. De todos os óleos testados, o óleo de cravo teve o efeito inibidor mais forte, indicado protetor na infecção de *L. garvieae* na tilápia e o potencial para substituir os antibióticos para o controle da doença (Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2009). Desse modo, são importantes as pesquisas que visam alternativas, como produtos naturais, potenciais para a utilização em sistemas aquícolas, que possam garantir o bem-estar aos animais, refletindo em melhoras zootécnicas.

## 2.10 Referências bibliográficas

ALHASSANE, T.; XU, X. M. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components and health benefits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 261-269, 2010.

ABRAMOVIC, H.; BUTINAR, B.; NIKOLI, V. Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. **Food Chemistry**, v. 104, p. 903-909, 2007;

AYALA, A.; MUÑOZ, M.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 20, p. 1-32, 2014.

AVDESH, A.; CHEN, M.; MARTIN-IVERSON, M. T.; MONDAL, A.; ONG, D.; RAINEY-SMITH, S.; TADDEI, K.; LARDELLI, M.; GROTH, D. M.; VERDILE, G.; MARTINS, R. N. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. **Journal of Visualized Experiments**, v. 69, p. 1-8, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMA, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475. 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE-PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. v. 2, p. 629-643, 2010.

BERGERON, S.; MILLA, L.; VILLEGAS, R., SHEN, M. C.; BURGESS, S.; ALLENDE, M., Expression profiling identifies novel Hh/Gli regulated genes in developing zebrafish embryos. **Genomics**, v. 91, p. 165-177, 2008.

BIONDO, P. B. F.; CARBONERA, F.; ZAWADZKI, F.; CHIAVELLI, L., PILAU, E. J.; PRADO, I. N.; VISENTAINER, J. Antioxidant Capacity and Identification of

Bioactive Compounds by GC-MS of Essential Oils from Spices, Herbs and Citrus. **Current Bioactive Compounds**, v. 12, p. 137-143, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; SERPIL, E.; KALAYCI. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Word Allergy Organ**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594. 2009.

BOZAN, P. A.; TEMELLI, F. Supercritical CO<sub>2</sub> extration of flaxseed. **J. AM. Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 213-235, 2002.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 47, p. 1239. 2009.

BRUM, A.; PEREIRA S. A.; OWATARI, M. S.; CHAGAS, C. E.; CHAVES, F. C. M.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235 – 243. 2017.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N.; ASTOLF, V.; SERAFINI, L. A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 30, p. 378-384, 2010.

CASTRO, L. F. C., MONROIG, O., LEAVER, M. J., WILSON, J., CUNHA, I., TOCHER, D. R. Functional desaturase Fads1 ( $\Delta 5$ ) and Fads2 ( $\Delta 6$ ) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. **Plos One**, v.7, p. 1-9. 2012.



CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: Thormar, H. **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents**, pp. 203-238, Wiley, Chichester, 2011.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. **Food Microbiol**, v. 24. p. 607-617, 2007.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, C.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza On-line**, v. 7, p. 37-42. 2009.

Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 77, p. 287-293, 2007

DAHAN, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 329-345, 2006.

DELAMARE, A. P. L.; MOSCHEN-PISTORELLO, I. T.; ARTICO, L.; ATTISERAFINI, L.; Echeverrigaray, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, p. 603-608, 2007.

DUTTA, S. P. S. Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting gadigarh stream, Jammu. **Journal of Freshwater Biology**, v. 5, p. 165-168. 1993.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.

ENGESZER, R. E.; PATTERSON, L. B.; RAO, A. A.; PARICHY, D. M. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, p. 21–40. 2007.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J.; A. H. A Nutrition committee american heart association omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the american heart association arterioscler. **Thromb Vascular Biology**, v. 23, p. 151-152, 2003.

FERNANDES, H.; PERES, H.; CARVALHO, A. P. Dietary protein requirement during juvenile growth of zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 13, p. 548-555, 2016.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperm*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 627-6241, 2008.

GIAN, C. T.; ETTORE, N.; ADRIANA, B. Nutraceutical potencial and antioxidante benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. **Journal of Funcional Foods**. v. 4, p. 129-136, 2012.

GÖKMEN, V.; SERPEN, A.; FOGLIANO, V. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the ‘QUENCHER’ approach. **Trends In Food Science & Technology**. v. 20, p. 278-288. 2009.

GOTH, L.; RASS, P.; PAY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular diagnosis: a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology**, v. 8, p. 141-149. 2004.

GOVARDHAN, S. R. S.; PRADEEP, S. N.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **Journal of Funcional Foods**, v. 5, p. 1883-1891, 2013.

GOYAL, A.; SHARMA, V.; UPADHYAY, N.; GIL, S.; SIHAG, M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51 p .1633-1653, 2014.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-118. 2004.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAŞ, M.; H.; ABOUL-ENEIN, Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 489-499, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4° Ed.; p. 851, Oxford University Press, 2007.

HASSAAN, M. S.; SOLTAN, M. A. Evaluation of essential oil of fennel and garlic separately or combined with bacillus licheniformis on the growth, feeding behaviour, hemato-biochemical indices of *Oreochromis niloticus* fry. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 7, p. 1-8, 2016.

HEDRERA, M.; GALDAMES, J.; GIMENEZ-REYES, M., REYES, A.; AVANDAÑO-HERRERA, R.; ROMERO, J. Soybean meal induces intestinal inflammation in zebrafish larvae. **Plos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

TOCHER, D.; GLENCROSS, B. D. Lipids and fatty acids. In: LEE, C.; LIM, C.; GATLIN, D. M.; WEBSTER, C. D. **Dietary nutrients, additives, and fish health**. Wiley Blackwell, New Jersey, 2015, 62-110 p.

HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; YANG, W. Taking a 'good' look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**, v. 21, p. 569-576, 2011.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicaais. In: Storey, K.B, **Funcional metabolismo: regulation and adaptation**. Wiley-Liss, Hoboken, 2004. 319-368 p.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; RAUCH, G. J.; WHITE, S.; CHOW, W.; KILIAN, B.; QUINTAIS, L. T.; GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A.; ZHOU, Y.; GU, Y.; YEN, J.; VOGEL, J. H.; EYRE, T.; REDMOND, S.; BANERJEE, R.; CHI, J.; FU, B.; LANGLEY, E.; MAGUIRE, S. F.; LAIRD, G. K.; LLOYD, D.; KENYON, E.; DONALDSON, S.; SEHRA, H.; ALMEIDA-KING, J.; LOVELAND, J.; TREVANION, S.; JONES, M.; QUAIL, M.; WILLEY, D.; HUNT, A.; BURTON, J.; SIMS, S.; MCLAY, K.; PLUMB, B.; DAVIS, J.; CLEE, C.; OLIVER, K.; CLARK, R.; RIDDLE, C.; ELLIOT, D.; THREADGOLD, G.; HARDEN, G.; WARE, D.; BEGUM, S.; MORTIMORE, B.; KERRY, G.; HEATH, P.; PHILLIMORE, B.; TRACEY, A.; CORBY, N.; DUNN, M.; JOHNSON, C.; WOOD, J.; CLARK, S.; PELAN, S.; GRIFFITHS, G.; SMITH, M.; GLITHERO, R.; HOWDEN, P.; BARKER, N.; LLOYD, C.; STEVENS, C.; HARLEY, J.; HOLT, K.; PANAGIOTIDIS, G.; LOVELL, J.; BEASLEY, H.; HENDERSON, C.; GORDON, D.; AUGER, K.; WRIGHT, D.; COLLINS, J.; RAISEN, C.; DYER, L.; LEUNG, K.; ROBERTSON, L.; AMBRIDGE, K.; LEONGAMORNLETT, D.; MCGUIRE, S.; GILDERTHORP, R.; GRIFFITHS, C.; MANTHRAVADI, D.; NICHOL, S.; BARKER, G.; WHITEHEAD, S.; KAY, M.; BROWN, J.; MURNANE, C.; GRAY, E.; HUMPHRIES, M.; SYCAMORE, N.; BARKER, D.; SAUNDERS, D.; WALLIS, J.; BABBAGE, A.; HAMMOND, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; BARR, L.; MARTIN, S.; WRAY, P.; ELLINGTON, A.; MATTHEWS, N.; ELLWOOD, M.; WOODMANSEY, R.; CLARK, G.; COOPER, J.; TROMANS, A.; GRAFHAM, D.; SKUCE, C.; PANDIAN, R.; ANDREWS, R.; HARRISON, E.; KIMBERLEY, A.; GARNETT, J.; FOSKER, N.; HALL, R.; GARNER, P.; KELLY, D.; BIRD, C.; PALMER, S.; GEHRING, I.; BERGER, A.; DOOLEY, C. M.; ERSAN-ÜRÜN, Z.; ESER, C.; GEIGER, H.; GEISLER, M.; KAROTKI, L.; KIRN, A.; KONANTZ, J.; KONANTZ, M.; OBERLÄNDER, M.; RUDOLPH-GEIGER, S.; TEUCKE, M.; LANZ, C.; RADDATZ, G.; OSOEGAWA, K.; ZHU, B.; RAPP, A.; WIDAA, S.; LANGFORD, C.; YANG, F.; SCHUSTER, S. C.; CARTER, N. P.; HARROW, J.; NING, Z.; HERRERO, J.; SEARLE, S. M.; ENRIGHT, A.; GEISLER, R.; PLASTERK, R. H.; LEE, C.; WESTERFIELD, M.; DE JONG, P. J.; ZON L. I.; POSTLETHWAIT, J. H.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; HUBBARD, T. J.; ROEST-CROLLIUS, H.; ROGERS, J.;

STEMPLE, D. L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-503, 2013.

IVANOVA, S.; RASHEVSKAYA, T.; MAKHONINA, M. Flaxseed additive application in dairy products production. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 275-280, 2011.

JANGELE, N. M.; DEVARSHI, P. P.; DUBAL, A.; GHULE, A.; KOPPIKKAR, S.; BODHANKAR, S. L.; CHOUGALE, D. A.; KULKARNI, M. J.; HARSULKAR, A. M. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Food Chemistry**. v. 141, p. 187-195, 2013.

KAUSHIK, S.; GEORGA, I.; KOUMOUNDOUROS, G. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. **Zebrafish**, v. 8, p. 87-95. 2011.

LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. **Fish ecotoxicology**. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, 1998. 203-224 p.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 119-145. 2014.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1-20, 2007.

LIM, K. S.; JEYASEELAN, K.; WHITEMAN, M.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1042, p. 210-220, 2005.

LIU, L.; SU, J.; LIANG, X. F.; LUO, Y. Growth performance, body lipid, brood amount, and rearing environment response to supplemental neutral phytase in zebrafish (*Danio Rerio*) diet. **Zebrafish**, v.10, p.433-438, 2013.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. **Critical Care**. v. 10, p. 1-8, 2006.

MASELLA, R.; DI, B. R.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586. 2005.

McCLURE, M. M.; MCINTYRE, P. B.; McCUNE, A. R. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 553-570, 2006.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 213-220, 2016.

MOURENTE, G.; GOOD, J. E.; THOMPSON, K. D.; BELL, J. G. Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). **The British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 770-779, 2007.

MULLA, M.; AHMED, J.; AL-ATTAR, H.; CASTRO-AGUIRRE, E.; ARFAT, Y. A.; AURAS, R. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. **Food Control**, v. 73, p. 663-671, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutritional requirements of fish and shrimp**. National Academies Press, Washington. p. 392, 2011.

NAYAK, M.; PRADHAN, A.; SAMANTA, M.; GIRI, S. S. Dietary fish oil replacement by linseed oil: Effect on growth, nutrient utilization, tissue fatty acid composition and desaturase gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) fingerlings. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 205, p. 1-12, 2017.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 27986-28006. 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009.

OYARBIDE, U.; RAINIERI, S.; PARDO, M. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a system to test the efficacy of polysaccharides as immunostimulants. **Zebrafish**, v. 9, p. 74-84, 2012.

PALEVITCH, O.; ABRAHAM, E.; BORODOVSKY, N.; LEVKOWITZ, G.; ZOHAR, Y.; GOTHILF, Y. Nasal embryonic LHRH factor plays a role in the developmental migration and projection of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 238, p. 66-75, 2009.

PELLIZZON, M. A.; BILLHEIMER, J. T.; BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O.; RADER, D. J. Flaxseed reduces plasma cholesterol levels in Hypercholesterolemic mouse models. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, 66-75, 2007.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B. SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 1075-1086, 2010.

POPA, V; M; GRUIA, A.; RABA, D. N.; DUMBRAVA, D.; MOLDOVAN, C.; BORDEAN, D.; MATEESCU, C. Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) from Romania. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 18, p. 136-140, 2012.

PRASAD, A. S.; BECK, F. W. J.; BAO, B.; FITZGERALD, J. T.; SNELL, D. C.; STEINBERG, J. D. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, p. 837-44, 2007.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, p. 2085-2086. 2009.

RODRIGUES, R. B.; AMORIM, Y.; ROCHA, J. M.; SILVA, T. C.; BRIDI, V.; FEIDE, A.; BITTENCOUT, F.; BOSCOLO, W. R.; Eugenol como anestésico para alevinos de patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 634-644, 2015.

RIBAS L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, p. 209-240, 2014.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. BELL, J. G. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish nutrition**. Academic Press, Amsterdam, 2002, 196-257 p.

SINGH, K. K.; MRIDULA, D.; REHAL, J.; BARNWAL, P. Flaxseed- a potential source of food, feed and fiber. **Critical Review In Food Science And Nutrition**, v. 51, p. 210-222, 2011.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, p. 4-5, 2012.



SOHAL, R. S.; ORR, W. C. The redox stress hypothesis of aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, 2012.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p. 63-71, 2007.

SUMANAS, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **DDT: Targets**, v. 3, p. 89-96, 2004.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; ELLIS, S.; AHMED, Z. F.; SMITH, C. The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 304–309. 2007.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD, M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M. A.; AHMED, Z. F.; SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**. v. 69, p. 1435-1448, 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13-34, 2008.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS CRISTINA, NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L.. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 587-595, 2013.

TRUCOM, C. Importancia da linhaça na saúde. São Paulo: Alaude, p. 151, 2006.

ULLOA, P. E., ITURRA, P.; NEIRA, R., ARANEDA, C. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 649-666, 2011.

ULLOA, P. E.; PEÑA, A.; LIZAMA, C. D.; ARANEDA, C.; ITURRA P.; NEIRA R., Growth response and expression of muscle growth-related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein-based diets. **Zebrafish**, v. 10, 99-109, 2013.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimica Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13: p. 57- 149. 2003.

VERTUANI, S.; ANGUSTI, A.; MANFREDINI, S. Os antioxidantes e de rede pro-antioxidante: uma visão global. **Atual Projeto Farmaceutica**, v. 10, p. 1677-1694, 2004.

WHIPPS, C.M.; MURRAY, K.N.; KENT, M.L. Occurrence of a Myxozoan Parasite 19 *Myxidium streisingeri* n. sp. in Laboratory Zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Parasitology**, v. 101, p. 86-90, 2015.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar no zebrafish o efeito da combinação do óleo de linhaça, como fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico e óleo essencial da folha de cravo como antioxidante na proteção dos ácidos graxos, de forma que possibilite a maior retenção dos ácidos graxos da serie n-3 no músculo dos peixes.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante das dietas experimentais;
- Analisar o crescimento dos animais;
- Avaliar a incorporação dos ácidos graxos no músculo;
- Avaliar a atividade de marcadores antioxidante no fígado;
- Avaliar o processo de peroxidação lipídica no fígado;
- Avaliar a expressão de gene PPAR $\alpha$  e SREBP-2, relacionado com a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e síntese do colesterol, respectivamente.

## 4. CAPITULO I

### Óleo de linhaça e óleo essencial da folha de cravo em dietas para zebrafish<sup>1</sup>

#### Resumo -

O óleo de linhaça é reconhecido como a fonte vegetal mais rica em ácido  $\alpha$ -linolênico, que são susceptíveis à ação nociva de radicais, sendo necessário uma proteção oxidativa. O óleo essencial da folha de cravo possui forte capacidade antioxidante, podendo atuar como agente de proteção contra os efeitos deletérios dos radicais livres. O presente estudo utilizou o zebrafish para avaliar os efeitos da dieta contendo a combinação do óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC). Os resultados mostraram que as dietas contendo OEFC apresentaram maiores atividades antioxidantes. O crescimento do zebrafish foi melhorado com aumento dos níveis do OL. Houve aumento na incorporação de ácidos graxos da série n-3 no músculo, concomitante aos níveis elevados do OL e do OEFC. Atividade do superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT) foi reduzida com níveis do OL e OEFC. O conteúdo da glutathione foi menor no tratamento com 0,5% do OEFC em combinação com OL. A peroxidação lipídica foi menor no tratamento com 0,5% do OEFC. Os genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-2 apontaram o mesmo comportamento, onde os tratamentos com 9 e 0,5% de OL e OEFC foram superiores aos demais. Portanto, recomenda-se uso combinado de 9% do OL com 0,5% do OEFC para zebrafish.

**Palavras-chave:** Antioxidante, ácido  $\alpha$ -linolênico, *Danio rerio*.

---

<sup>1</sup>Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico Scientific Reports

## Introdução

Os peixes, assim como os demais vertebrados, não podem realizar a síntese do ácido linoleico (18:2n-6) e  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) por não possuírem a enzima dessaturase específica, tornando-os ácidos graxos essenciais e, portanto, devem ser fornecidos pela dieta para evitar deficiências nutricionais<sup>1,2</sup>, pois são fundamentais para o crescimento normal e sobrevivência dos animais<sup>3</sup>.

Em comparação com outros óleos vegetais, o óleo de linhaça se distingue por ser a fonte mais rica em ácido  $\alpha$ -linolênico<sup>4</sup>, precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que são fisiologicamente importantes com função imunológica<sup>5</sup>.

Quantidades excessivas na dieta de ácidos graxos poliinsaturados como  $\alpha$ -linolênico podem elevar o índice de insaturação de lipídios nos tecidos dos peixes e torná-los propensos a ataque de radicais livres (EROS)<sup>6</sup>, que são gerados como subprodutos do metabolismo celular normal de oxigênio ou por tensões externas. Estes EROS, tais como peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxilo podem atacar a membrana fosfolipídica das células, reagir com proteínas celulares e ácidos nucleicos e danificá-las, levando à imunossupressão<sup>7</sup>.

Para proteger as células dos danos, o organismo desenvolveu mecanismos de proteção, como ação das enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e superóxido dismutase (SOD)<sup>8</sup>. Quando a taxa de produção de EROS é maior do que a capacidade de eliminação do sistema defesa, torna-se necessário um antioxidante exógeno, que pode ser oriundo da dieta. A esse respeito, o óleo de cravo apresenta a maior capacidade antioxidante, dentre os óleos essenciais comumente comercializados<sup>9</sup>.

O constituinte principal do óleo de cravo é o eugenol, ao qual são atribuídas muitas das propriedades antioxidantes<sup>10</sup>. Gülçin et al.<sup>11</sup> mostraram que o óleo de cravo inibiu 97,3% de peroxidação lipídica na emulsão de ácido linoleico a uma concentração de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O efeito protetor de 0,5% óleo de cravo na dieta foi relatado em alevinos de carpa rohu (*Labeo rohita*) através da redução da atividade SOD e do nível de peroxidação lipídica<sup>12</sup>.

O zebrafish é um modelo experimental consolidado em diversas áreas de pesquisa, sendo utilizado em ensaios de biomedicina a toxicologia<sup>13,14</sup>. Recentemente, vem sendo considerado como modelo para investigação na aquicultura em estudos de

nutrição, reprodução, bem-estar<sup>15,16</sup>. Entre as vantagens desse modelo, estão a facilidade de manejo na criação, alta capacidade reprodutiva, rápido desenvolvimento e genoma sequenciado<sup>15,17</sup>.

No presente estudo, o zebrafish foi utilizado para avaliar os efeitos da combinação do óleo de linhaça e do óleo essencial da folha de cravo sobre o crescimento dos peixes, incorporação de ácidos graxos no músculo, estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e expressão de genes envolvidos  $\beta$ -oxidação e síntese do colesterol.

## Resultados

- Determinação da capacidade antioxidante das dietas

O resultado demonstra efeito de interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ), onde os tratamentos contendo 1% do OEFC embora combinado com 3, 6 ou 9% do OL apresentaram médias superiores às dietas com 0,5%. Além disso, a associação do OL e OEFC proporcionaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante das dietas, em comparação ao tratamento controle com aumento médio de 270% (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da capacidade antioxidante das dietas contendo óleo de linhaça e óleo essencial da folha de cravo analisados através do ensaio de DPPH.

Resposta	Valor de p	Óleo de linhaça (%)	Óleo essencial folha de cravo (%)		
			0,00	0,50	1,00
DPPH	<0,001*	0,00	13,70±0,13	-	-
		3,00	-	37,28±1,27 Bb**	49,91±1,51 Aa**
		6,00	-	41,52±1,44 Ab**	49,93±1,75 Aa**
		9,00	-	37,84±1,75 Bb**	51,43±0,97 Aa**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica efeito de interação ( $p < 0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

- Desempenho produtivo

Nenhuma mortalidade foi observada durante o experimento, portanto a sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos. Não houve efeito de interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ), somente efeito isolado para o OL sobre o peso final e ganho em peso ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2), contribuindo para aumento das respectivas características. Os peixes alimentados com OL e OEFC apresentaram melhora em comparação com o grupo controle.

Tabela 2: Avaliação das características de crescimento de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Componentes	Resposta	
	GP (g)	PF (g)
<i>Efeitos</i>		
Linhaça	0,017*	<,0001*
Cravo	0,122 <sup>ns</sup>	0,122 <sup>ns</sup>
<i>Fatores</i>		
Controle	0,08±0,01	0,37 ± 0,01
OL		
3%	0,15±0,03 b**	0,44±0,03 b**
6%	0,22±0,05 a**	0,50±0,06 a**
9%	0,21±0,03a**	0,50±0,04 a**
OEFC		
0,5%	0,21±0,06**	0,50±0,06**
1%	0,17±0,01**	0,46±0,03**

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica efeito isolado dos fatores ( $p < 0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

O comprimento total final (CF) e a taxa de crescimento específico (TCE) mostraram efeito de interação ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Para a taxa de crescimento específico, a melhor reposta foi a combinação de 6% do OL e 0,5% do OEFC, sendo que somente os tratamentos com 3% do OL e 0,5 ou 1% do OEFC foram iguais ao controle ( $p > 0,05$ ). O comprimento final mostrou aumento com níveis do OL, mesmo que associado com 0,5 ou 1% do OEFC. Somente o tratamento incluído 3% do OL com 0,5% do OEFC foi igual ao grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3: Avaliação das características de crescimento de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Resposta	Valor de p	Óleo de linhaça (%)	Óleo essencial folha de cravo (%)		
			0,00	0,50	1,00
TCE (% de peso dia <sup>-1</sup> )	0,002*	0,00	0,46±0,07	-	-
		3,00	-	0,74±0,15 Ba	0,78±0,14 Aa
		6,00	-	1,15±0,15 Aa**	0,85±0,09 Ab**
		9,00	-	1,04±0,13 ABa**	0,93±0,12 Aa**
CF (mm)	<0,001*	0,00	31,07±1,65	-	-
		3,00	-	33,23±1,29 Bb	34,16±1,59 Bb**
		6,00	-	34,79±1,12 ABa**	34,23±1,29 Ba**
		9,00	-	36,38±1,35 Aa**	36,89±1,02 Aa**

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica efeito de interação ( $p < 0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

- Incorporação dos ácidos graxos no músculo de zebrafish

Os ácidos graxos saturados não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). A soma dos ácidos monoinsaturados, araquidônico (ARA, 20:4n-6) e da série n-6 apresentaram efeito isolado ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). O teor de ácido graxo monossaturado aumentou com os níveis crescentes do OL e não houve diferença dos tratamentos com o grupo controle ( $p > 0,05$ ). O conteúdo de ARA e o n-6 reduziu-se com a inclusão do OL. A média do grupo controle foi significativamente superior aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), exceto para o nível de 3% do OL para a série n-6 (Tabela 4).



Tabela 4: Perfil de ácidos graxos (% do total) no músculo de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dieta contendo óleo de linhaça (OL) e o óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Componentes	Ácido graxo			
	<sup>1</sup> ΣSat	<sup>2</sup> ΣMono	20:4n-6	n-6
<i>Efeitos</i>				
Linhaça	0,293 <sup>ns</sup>	0,018*	<0,001*	<0,001*
Cravo	0,104 <sup>ns</sup>	0,338 <sup>ns</sup>	0,550 <sup>ns</sup>	0,729 <sup>ns</sup>
<i>Fatores</i>				
Controle	27,89±1,04	37,80±1,85	2,80±0,15	27,70±<0,01
OL				
3%	27,74±1,39	36,39±1,28 b	2,35±0,20 a**	27,71±1,03 a
6%	27,61±1,31	38,31±1,54 a	1,72±0,24 b**	22,46±0,61 b**
9%	26,94±1,18	39,26±1,37 a	1,43±0,13 c**	18,64±0,65 c**
OEFC				
0,5%	28,12±0,99	38,28±1,05	1,86±0,47**	22,75±3,22**
1%	26,74±0,81	37,72±1,11	1,80±0,42**	22,93±4,58**

<sup>1</sup>ΣSat: soma dos ácidos graxos saturados. <sup>2</sup>ΣMono soma dos ácidos graxos monoinsaturados. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes (p<0,05). (\*) indica efeito isolado dos fatores (p<0,05). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett (p<0,05).

O ácido linoleico (18:2n-6) mostrou efeito de interação (p<0,05), diminuindo com adição do OL nas dietas, embora associados com 0,5 ou 1% do OEFC. Diferentemente da dieta contendo 3% do OL e 0,5% OEFC, os demais tratamentos foram significativamente menores que o grupo controle (p<0,05) (Tabela 5).

O ácido eicosadienóico (20:2n-6) apresentou efeito de interação entre os fatores (p<0,05). Tratamentos contendo 0,5% do OEFC reduziram-se com a inclusão do OL. De modo semelhante, houve redução desse ácido com aumento de 6 para 9% OL em conjunto com 1% do OEFC. Somente a combinação de 6% do OL com 0,5 e 1% do OEFC foram iguais (p>0,05). Para os demais tratamentos, a associação com 1% OEFC apresenta médias inferiores (Tabela 5). A incorporação do ácido eicosadienóico foi menor nos peixes alimentados com dietas incluídas com OL e OEFC comparadas ao controle.

Houve efeito de interação para o ácido dihomo-gama-linolenico (20:3n-6) (p<0,02), onde foi reduzido com os níveis crescentes do OL conciliado com 1% do OEFC. Apenas os tratamentos com 6% do OL com 0,5 e 1% do OEFC foram iguais. Os tratamentos 3 e 6% de OL com 0,5% do OEFC foram iguais ao controle (p>0,05) (Tabela 5).

A quantidade dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18:3n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e ácido docosaexanóico (DHA, 22:6n-3) aumentaram concomitantemente com os níveis de inclusão do OL e OEFC, apontando médias significativamente superiores ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Deste modo, os ácidos graxos da série n-3 apresentaram efeito de interação ( $p < 0,05$ ). O aumento da série n-3 no músculo de zebrafish foi em conjunto com a inclusão do OL e do OEFC, exceto para fator OEFC com 6% de OL que são iguais ( $p > 0,05$ ). A relação n-6/n-3 exibiu efeito de interação ( $p < 0,05$ ), reduzindo-se com a adição do OL e OEFC. Os tratamentos com 3% do OL foram superiores ao grupo controle e os demais, significativamente menores ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos (% do total) no músculo de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dieta contendo óleo de linhaça (OL) e o óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Ácido graxo	Valor de p	Óleo de linhaça (%)	Óleo essencial folha de cravo (%)		
			0,00	0,50	1,00
18:2n-6	<,001*	0,00	22,72±1,25	-	-
		3,00	-	22,30±0,51 Aa	21,97±2,06 Ab**
		6,00	-	19,13±0,76 Ba**	19,35±0,14 Ba**
		9,00	-	15,32±0,20 Ca**	15,56±0,55 Ca**
20:2n-6	0,016*	0,00	0,48±0,05	-	-
		3,00	-	0,29±<0,01 Aa**	0,20±0,02 Ab**
		6,00	-	0,22±<0,01 Aa**	0,21±<0,01 Aa**
		9,00	-	0,21±0,01 Ba**	0,18±<0,01 Ab**
20:3n-6	<,001*	0,00	1,68±0,10	-	-
		3,00	-	1,52±0,07 Aa	1,38±0,11 Ab**
		6,00	-	1,57±0,03 Aa	1,14±0,07 Ba**
		9,00	-	1,30±0,06 Ba**	0,87±0,02 Cb**
18:3n-6	<,001*	0,00	2,45±1,09	-	-
		3,00	-	4,10±0,06 Cb**	5,20±0,11 Ca**
		6,00	-	7,17±0,58 Bb**	7,70±0,09 Ba**
		9,00	-	9,96±0,43 Ab**	11,17±0,61 Aa**
20:5n-3	0,005*	0	0,16±<0,01	-	-
		3,00	-	0,31±0,05 Cb**	0,42±0,02 Ca**
		6,00	-	0,58±0,03 Ba**	0,60±0,02 Ba**
		9,00	-	0,69±0,06 Ab**	0,87±0,02 Aa**
22:6n-3	0,003*	0,00	2,06±0,10	-	-
		3,00	-	3,04±0,56 Ba**	3,31±0,09 Ba**
		6,00	-	3,66±0,29 Aa**	3,53±0,09 Ba**
		9,00	-	3,33±0,18 Ab**	4,31±0,01 Aa**
n-3	0,008*	0,00	4,67±0,23	-	-
		3,00	-	7,45±0,67 Cb**	8,94±0,21 Ca**
		6,00	-	11,42±0,31 Ba**	11,83±0,08 Ba**
		9,00	-	13,97±0,67 Ab**	16,35±0,59 Aa**
n6/n3	0,005*	0,00	2,26±0,04	-	-
		3,00	-	3,57±0,30 Aa**	3,16± 0,23 Ab**
		6,00	-	1,98±0,12 Ba**	1,88±0,04 Ba**
		9,00	-	1,32±0,08Ca**	1,11±0,03 Cb**

<sup>1</sup>ΣSat: soma dos ácidos graxos saturados. <sup>2</sup>ΣMono soma dos ácidos graxos monoinsaturados. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha são estatisticamente diferentes (p<0,05). (\*) indica efeito de interação (p<0,05). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett (p<0,05)

- Avaliação da atividade antioxidante e nível de peroxidação

A atividade da SOD apresentou efeito isolado para os ambos os fatores ( $p<0,05$ ) e a CAT apontou efeito isolado apenas para o OL ( $p<0,05$ ). A SOD e CAT mostraram decréscimo na sua atividade, conforme o aumento dos níveis do OL e OEFC nas dietas. A ação destas enzimas foi significativamente menor com relação tratamento controle ( $p<0,05$ ) (Tabela 6).

O TBARS apresentou efeito isolado ( $p<0,05$ ), com diminuição da concentração de acordo com os níveis do OEFC. Os resultados mostram redução no nível de TBARS nos tratamentos com OL ou OEFC comparados ao grupo controle ( $p<0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6: Marcadores antioxidantes e peroxidação lipídica (TBARS) avaliados em zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Componentes	Marcadores antioxidantes			
	<sup>1</sup> SOD	<sup>2</sup> CAT	<sup>3</sup> TBARS	<sup>4</sup> GPx
<i>Efeito</i>				
Linhaça	0,004*	0,021*	0,446 <sup>ns</sup>	0,631 <sup>ns</sup>
Cravo	<,001*	0,228 <sup>ns</sup>	0,043*	0,664 <sup>ns</sup>
<i>Fatores</i>				
Controle	1,98±0,12	11,98 ±0,73	3,17±0,58	172,15±19,20
Linhaça				
3%	1,13±0,32 a**	3,47±0,99 a**	2,16±0,61**	137,18±28,60
6%	0,92±0,47 ab**	3,59±1,11a**	1,79±0,55**	155,60±17,69
9%	0,64±0,25 b**	1,90±1,42b**	1,90±0,27**	144,16±38,97
Cravo				
0,5%	1,51±0,33 a**	3,21±1,34**	2,26±0,51 a**	149,80±28,61
1%	0,63±0,28 b**	2,88±1,02**	1,89±0,63 b**	142,19±30,67

<sup>1</sup>Superóxido desmutase (U de SOD mg<sup>-1</sup>). <sup>2</sup>Catalase ( $\epsilon$ , 33,33 M<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>). <sup>3</sup>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA mg<sup>-1</sup> de proteína). <sup>4</sup>Glutationa peroxidase ( $\epsilon$ , 6,22 M<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>). Valores seguidos de letras distintas na coluna são estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ). (\*) indica efeito isolado dos fatores ( $p<0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p<0,05$ ).

A atividade da GSH exibiu efeito de interação ( $p<0,05$ ). Quando se observa o efeito do OEFC dentro dos níveis do OL, nota-se a redução da atividade da GSH com 0,5% do OEFC associado com 6 ou 9% de OL (Tabela 7). Além disso, os tratamentos com 1% do OEFC apresentaram médias superiores ao controle, contrariamente às dietas com 0,5%.

Tabela 7: Atividade da glutatona avaliados em zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Resposta	Valor de p	Óleo de linhaça (%)	Óleo essencial folha de cravo (%)		
			0,00	0,50	1,00
<sup>1</sup> GSH	0,034*	0,00	2,77 ± 0,32	-	-
		3,00	-	2,88±0,20 Aa	3,22±0,54 Ba**
		6,00	-	2,53±0,23 Ab**	3,94±0,31 ABa**
		9,00	-	2,47±0,31 Ab**	4,46±0,53 Aa**

<sup>1</sup>Glutaciona ( $\mu\text{g GSH mg}^{-1}$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica efeito de interação ( $p < 0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ )

- Análise de expressão gênica

Os genes avaliados exibiram efeito de interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ), onde o PPAR- $\alpha$  e SREBP-2 apresentaram o comportamento semelhante (Tabela 8). Os grupos de peixes alimentados com dieta contendo 9 e 0,5% do OL e OEFC exibiram médias superiores aos demais tratamentos.

Tabela 8: Expressão gênica avaliados em zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas experimentais contendo óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC).

Resposta	Valor de p	Óleo de linhaça (%)	Óleo essencial folha de cravo (%)		
			0,00	0,50	1,00
<sup>1</sup> PPAR- $\alpha$	0,010*	0,00	0,05±0,11	-	-
		3,00	-	0,13±0,02 Ba**	0,61±0,45 Aa**
		6,00	-	0,32±0,32 Ba**	0,21±0,03Aa**
		9,00	-	1,12±0,30 Aa**	0,18 ±,28 Ab**
<sup>2</sup> SREBP-2	<0,001*	0	0,06±<0,01	-	-
		3,00	-	0,11±<0,01 Cb**	0,20±0,03 Aa**
		6,00	-	0,19±<0,01 Ba**	0,50±0,25 Aa**
		9,00	-	2,89±<0,01 Aa**	0,24±0,14 Ab**

<sup>1</sup>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR $\alpha$ ). <sup>2</sup>Proteína de ligação ao elemento regulador de estero 2 (SREBP-2). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Valores seguidos de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). (\*) indica efeito de interação ( $p < 0,05$ ). (\*\*) difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

O aumento da capacidade antioxidante das dietas está relacionado principalmente com a presença de compostos fenólicos existentes no OEFC, o qual é constituído por 81 a 86% de eugenol, sendo seu principal representante bioativo com capacidade antioxidante<sup>18</sup>. Estudos anteriores comprovam a atividade antioxidante do OEFC através da redução de radicais de DPPH em concentrações inferiores ao hidroxitolueno (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA). Além disso, mostrou efeito inibitório sobre os radicais hidroxila, como quelante de ferro e na peroxidação lipídica<sup>19</sup>. Um estudo recente relata resultados superiores da capacidade antioxidante do OEFC, através de ensaios de DPPH, ABTS e ORAC, no conjunto de 18 amostras de óleos essenciais<sup>20</sup>.

Os peixes adaptaram-se bem às dietas experimentais, pois não houve mortalidade durante o período do estudo com 55 dias de alimentação. Araújo *et al.*<sup>21</sup> também mencionam que não houve mortalidade em zebrafish submetidos a um teste de alimentação por cinco meses, avaliando o óleo de linhaça, oliva, peixe e milho.

Com relação ao desempenho produtivo, o OL melhorou o GP do zebrafish, contrariamente a inclusão do OEFC, onde a 1% proporcionou efeito adverso. A TCE e o CF aumentaram com os níveis do OL, combinados com 0,5 ou 1% do OEFC. O resultado do presente estudo concorda com relatos na literatura de que o aumento lipídico a um nível adequado pode melhorar o crescimento em peixes, pois são atendidos os requisitos de energia e principalmente de ácido graxo essencial, como o ácido  $\alpha$ -linolênico<sup>22</sup>.

Em zebrafish, foi demonstrado crescimento linear quando os peixes foram alimentados com dietas contendo 14 a 47% de ácidos graxos da série n-3<sup>23</sup>. Outras pesquisas relataram que zebrafish alimentadas com 6% de OL não prejudicou seu crescimento<sup>24</sup>. Para a carpa comum e tilápia do Nilo, o maior crescimento foi observado com o uso de 5 e 7,5% do OL na dieta, respectivamente<sup>25,26</sup>. De acordo com os autores, alto nível lipídico na dieta (mais de 7%) poderia reduzir o crescimento dos peixes devido à baixa capacidade de digerir e absorver o excesso de lipídico, a redução do consumo de ração e desequilíbrio de ácidos graxos na dieta. O resultado do presente estudo mostra que o zebrafish é mais efetivo no aproveitamento de dietas com alto teor de lipídeos.

O perfil dos ácidos graxos no músculo do zebrafish foi claramente afetado pela composição lipídica das dietas experimentais. Esta observação é consistente com o conceito geral de que a composição de ácidos graxos no tecido de peixes é, em grande parte, reflexo das respectivas dietas<sup>7,27</sup>.

O aumento no conteúdo de ácido graxos monoinsaturados pode ser explicado pelo aumento dietético, em vista que o OL possui na sua composição aproximadamente 18% do ácido oleico<sup>28</sup> e também pela contribuição do óleo milho que manteve os níveis dos ácidos monoinsaturados ainda em substituições baixas do OL, tornando-o igual ao grupo controle. A inclusão de 9% do OL e óleo de milho em dietas para zebrafish não causaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na composição de ácido monoinsaturados na carcaça dos animais<sup>21</sup>.

O conteúdo muscular de ácido linoleico (18:2n-6) diminuiu em resposta à composição lipídica das dietas e como precursor da série n-6, conseqüentemente, houve decréscimo nos ácidos eicosadienoico (20:2n-6), dihomogama linolênico (20:3n-6) e araquidônico (ARA, 20:4n-6). A inclusão de níveis crescente do OL e, portanto, quantidades graduais de ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) na dieta, resultou em aumento do 18:3n-3 no músculo e dos seus homólogos de cadeia longa, o ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5n-3) e docosaexanoico (DHA, 20:4n-3).

O resultado do presente estudo é confirmado com outros na literatura, onde o perfil de ácidos graxos no músculo de zebrafish refletiu a composição lipídica da dieta<sup>21,29</sup>. Em uma dieta formulada para fornecer 1% de ácido  $\alpha$ -linolênico e linoleico para zebrafish e tilápia, foi observado o mesmo padrão para a dessaturação e alongamento dos ácidos graxos<sup>30</sup>. Em geral, os peixes de água doce, possuem a capacidade para alongar e dessaturar os ácidos graxos da série n-3 e n-6 (C18) para seus respectivos homólogos de cadeia longa (C20 e C22), no entanto o acúmulo no tecido depende da quantidade fornecida na alimentação<sup>31,32</sup>.

Diferentemente do DHA, houve baixo acúmulo de EPA no músculo do zebrafish. Os ácidos graxos, independentemente do tamanho da cadeia ou número de insaturações, são importantes fontes de energia, contudo o DHA tende a ser conservado na bicamada fosfolipídica das membranas, desempenhando funções estruturais e funcionais<sup>33</sup>. No presente estudo, em função dos resultados obtidos, apoia-se a hipótese de que o EPA seja provavelmente direcionado para atender às diferentes necessidades metabólicas tais como, conversão em DHA, síntese de eicosanídeos e produção de energia através da  $\beta$ -oxidação, levando à sua redução nos tecidos<sup>34,35,36</sup>.

O OEFC contribuiu para a maior retenção destes ácidos, desempenhando sua função de antioxidante, protegendo-os contra a ação de radicais livres, promovendo a melhora na assimilação desses lipídeos<sup>37</sup>. Em truta comum (*Salmo trutta caspius*), o  $\alpha$ -tocoferol promoveu a proteção de EPA e DHA, contra a oxidação na membrana celular, possibilitando a maior incorporação desses ácidos<sup>7</sup>.

No presente estudo, a relação n-6/n-3 foram inferiores a 4,0, que está de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde<sup>38</sup> para nutrição humana, sendo que o tratamento 6% do OL combinado com 0,5 ou 1% do OEFC, estão dentro do considerado ideal de 2 a 1,5:1 n-6/n-3. Em geral, os peixes de água doce selvagens são caracterizados pela proporção de 5 a 6:1 de n-6/n-3<sup>39</sup>. Tonial *et al.*<sup>40</sup> também encontraram redução na relação n-6/n-3 (1:1) para tilápia do Nilo alimentada com dieta contendo 7% óleo de linhaça comparadas ao grupo com 7% do óleo de soja, além da diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na melhora do crescimento. Pesquisas que visam baixar esta proporção buscando aumentar o valor nutritivo do alimento, sem que haja prejuízo para a saúde e conseqüentemente, para o desempenho produtivo do animal, são importantes para aquicultura.

O nível de TBARS é usado para medir a extensão da peroxidação lipídica<sup>41</sup>. No presente estudo, o óleo essencial da folha de cravo foi responsável pelo aumento da peroxidação lipídica, como indicado pelos níveis de TBARS, sendo que o tratamento com 0,5% exerceu maior proteção oxidativa. Esse resultado pode ser esclarecido através do aspecto toxicológico, pois toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, tais como a dose administrada, tempo e a frequência de exposição<sup>42</sup>. Sendo assim, a nível de 1% na dieta para zebrafish, o óleo essencial da folha pode ter manifestado efeito adverso levando o aumento do estresse oxidativo.

Este resultado é semelhante ao encontrado em carpa rohu (*Labeo rohita*), onde o efeito protetor do óleo essencial de cravo, como antioxidante natural na dieta, foi relatada uma diminuição no nível de peroxidação lipídica nos peixes alimentados com 0,5% em comparação com o grupo tratado com 1% deste óleo<sup>12</sup>.

As atividades da SOD e CAT foram reduzidas pelos níveis crescentes do OL e do OEFC, sendo que a atividade da CAT apresentou efeito isolado do óleo de linhaça. Isto ocorreu em virtude da presença de compostos fenólicos presentes nestes óleos, que confere a atividade antioxidante<sup>43,44</sup>, reduzindo o substrato de ação destas enzimas que conseqüentemente levou à diminuição de suas atividades<sup>45,46</sup>.



Este resultado é confirmado no estudo realizado com tilápia do Nilo, onde a inclusão de 7% do OL reduziu o nível de peroxidação lipídica e atividade da SOD<sup>25</sup>. Para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), também foi verificada redução da SOD com uso de 10% de OL na dieta, comparada ao grupo alimentado com óleo de cartamo (fonte de ácido linoleico)<sup>47</sup>.

É possível notar que o nível de peroxidação lipídica (TBARS) e atividade da SOD são inversamente proporcionais, ou seja, o aumento do estresse oxidativo é concomitante à redução da SOD para fator isolado do OEFC. Este achado pode ser explicado pela resposta adaptativa das enzimas antioxidantes, onde o estresse crônico provocado pelo tempo de alimentação (55 dias), levou à inibição ou redução desta enzima<sup>48</sup>, como observado em carpa rohu (*L. rohita*) alimentadas por 56 dias com 0,5% do óleo essencial de cravo<sup>12</sup>.

Neste estudo, o aumento da GSH corresponde ao mecanismo fisiológico que combate a elevação dos radicais livres sob o estresse oxidativo. Dieta com 0,5% o OEFC, indiferente da quantidade de óleo de linhaça, indica uma função antioxidante, em virtude da diminuição significativa da GSH comparada com peixes alimentados com 1% deste óleo, sendo que para este nível, o acréscimo dietético do OL também contribuiu para aumento da GSH, em virtude de altas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (série n-3) propensos a danos oxidativos através de reações em cadeia de radicais livres<sup>49</sup>.

Os ácidos graxos poliinsaturados, especialmente da série n-3 são ativadores naturais do PPAR $\alpha$ <sup>50,51</sup>. Como esperado, foi observado neste estudo o aumento da expressão do PPAR $\alpha$  no fígado de zebrafish, com proeminência do tratamento com 9% do óleo de linhaça combinado com 0,5% do óleo da folha de cravo. Isto ocorreu em virtude das dietas que continham quantidades crescentes de ácido alfa-linolênico e pela melhor proteção contra a peroxidação lipídica ao nível de 0,5% do óleo essencial de cravo.

O resultado deste estudo corrobora com o ensaio realizado para avaliar os efeitos dos ácidos graxos da série n-3 no metabolismo lipídico em carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*), onde é relatado aumento da expressão PPAR $\alpha$  no fígado e no músculo em peixes alimentados com dieta contendo maior quantidade de ácido alfa-linolênico, EPA e DHA<sup>25</sup>. Foi confirmado também aumento da ativação do PPAR $\alpha$  quando o conteúdo dietético de n-3 aumentou de 0,23% para 1,29% em dietas para juvenis de pargo (*Acanthopagrus schlegelii*)<sup>52</sup>. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus*

*mykiss*) houve maior ativação nos peixes alimentados com OL na dieta, comparados com óleo de soja e óleo de peixe<sup>53</sup>.

O PPAR $\alpha$  é conhecido por ter função crítica na regulação da homeostase lipídica<sup>54</sup>, ativando o catabolismo lipídico através da regulação da expressão de genes alvo que codificam enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação peroxissomal e mitocondrial<sup>55,56</sup>.

O aumento da expressão do PPAR $\alpha$  também está associado com a diminuição na deposição de lipídeo no hepatócito<sup>57</sup>. No trabalho realizado com carpa boi (*Megalobrama amblycephala*) houve redução do PPAR $\alpha$  levou ao acúmulo de gordura no hepatócito, acompanhada de atrofia nuclear, caracterizando a esteatose e ainda os peixes apresentaram crescimento reduzido. Resultado contrário foi relatado em peixes com maior expressão do PPAR $\alpha$  e maior  $\beta$ -oxidação<sup>58</sup>.

A respeito do SREBP-2, sua função principal é controlar a biossíntese de colesterol<sup>59</sup>. Em particular, o SREBP-2 é um fator de transcrição que reside no retículo endoplasmático, que possui atividade de forma dependente do colesterol e, portanto, está profundamente envolvido na regulação da expressão de genes relacionados ao seu metabolismo<sup>60</sup>. Na presença de colesterol, o SREBP-2 é ligado a duas outras proteínas: SCAP (SREBP-proteína de ativação de clivagem) e INSIG-1 (Insulina induzida pelo gene 1). Quando o nível de colesterol na membrana diminui, o SCAP muda sua conformação e facilita a dissociação do INSIG-1, permitindo que o complexo SREBP-2/SCAP migre para o aparelho de Golgi, onde são clivados pelas proteases S1P e S2P (sítio 1 e sítio 2 protease) ativadas por SCAP. O SREBP2 clivado migra então para o núcleo, onde se liga aos promotores de genes alvo SREBP, incluindo genes envolvidos na síntese e metabolismo do colesterol, levando ao aumento no nível de colesterol na célula<sup>61</sup>. Quando o colesterol se acumula nas membranas do retículo endoplasmático, o complexo SREBP-2/Scap é retido, a ativação proteolítica de SREBPs é interrompida e a expressão de genes alvo de SREBP diminui<sup>62</sup>.

No presente trabalho, foi observado o aumento da expressão do SREBP-2. Este resultado pode ser explicado em virtude dos óleos e dietas vegetais possuírem deficiência de colesterol<sup>63</sup>. Além disso, estão presentes em óleos vegetais outros esteróis como sitosterol, estigmasterol, campesterol e brassicasterol, que podem inibir a absorção de colesterol e são poucos susceptíveis de serem absorvidos pelos peixes<sup>64,65</sup>. Isto mostra que aumento do óleo de linhaça e a proteção do OEFC provocou efeito inibitório do colesterol, em virtude do aumento SREBP-2. Castro *et al.*<sup>66</sup> observaram que a concentração de colesterol foi menor nos peixes alimentados com óleo vegetal

comparados com o grupo tratado com óleo de peixe. No estudo realizado por Leaver *et al.*<sup>67</sup>, avaliou-se a substituição do óleo de peixe por óleos vegetais (canola, soja e linhaça) em dietas para salmão (*Salmo salar*). Os resultados indicam aumento da expressão do SREBP-2 em todas as dietas com óleo vegetal, sendo, portando um importante regulador do nível de colesterol.

## Conclusão

A capacidade antioxidante das dietas foi aumentada. Além de melhorar o crescimento dos animais, houve maior incorporação de ácidos graxos da série n-3, redução da peroxidação lipídica e da atividade antioxidante. A análise de expressão mostrou aumento da  $\beta$ -oxidação, que está diretamente relacionado com a redução no acúmulo de gordura hepático e a diminuição na síntese do colesterol. Portanto, recomenda-se a combinação de 6% do óleo de linhaça com 0,5% do óleo essencial da folha de cravo.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais do Núcleo de Pesquisa PeixeGEN - Manejo, Melhoramento e Genética Molecular em Piscicultura de Água Doce, localizado no bloco J-35, sala 201 da Universidade Estadual de Maringá – UEM, por um período de 55 dias.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob o protocolo nº 8851180216 de maio de 2016.

- Dietas experimentais e manejo alimentar

Foram elaboradas seis dietas experimentais de acordo com as recomendações nutricionais propostas por Siccardi *et al.*<sup>69</sup>, com os seguintes níveis de inclusões do óleo de linhaça (OL) e óleo essencial da folha de cravo (OEFC): O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em esquema fatorial com adição do tratamento controle (3x2+1).

- Dieta 1: Controle, sem a inclusão do OL e OEFC.
- Dieta 2: 3% de OL + 0,5% OEFC;
- Dieta 3: 3% de OL + 1% OEFC;

- Dieta 4: 6% de OL + 0,5% OEFC;
- Dieta 5: 6% de OL + 1% OEFC;
- Dieta 6: 9% de OL + 0,5% OEFC;
- Dieta 7: 9% de OL + 1% OEFC.

A composição das dietas e o perfil dos ácidos graxos estão apresentados na Tabela 9 e 10.

Tabela 9: Composição percentual das dietas experimentais.

Ingredientes	Níveis de inclusão (%)						
	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7
Isolado protéico de soja	50,90	50,90	50,90	50,90	50,90	50,90	50,90
Milho	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Glúten de milho	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06	7,06
Óleo milho	10,00	6,50	6,00	3,50	3,00	0,50	0,00
OL	0,00	3,00	3,00	6,00	6,00	9,00	9,00
OEFC	0,00	0,50	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00
Quirera de arroz	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicalcico	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63
Lisina	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14	1,14
<sup>1</sup> Suplemento mineral e vitamínico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
DL-Metionina	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
Calcário Calcítico	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
Sal comum	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Triptofano	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
<i>Composição proximal</i>							
Proteína bruta	51,82	51,26	51,15	50,97	51,06	50,85	51,47
Energia (kj g <sup>-1</sup> )	17,16	17,28	17,57	17,23	17,41	17,68	17,13
Extrato étereo	11,26	11,09	11,52	11,63	11,06	11,81	11,32
Cálcio	1,10	1,26	1,03	1,16	1,15	1,32	1,01
Fósforo total	1,33	1,14	1,29	1,22	1,17	1,55	1,10

<sup>1</sup>Níveis garantidos por quilo de produto: vit. A - 500,000 IU; vit. D3 - 200,000 IU; vit. E - 5,000 mg; vit. K3 - 1000 mg; vit. B1 - 1,500 mg; vit. B2 - 1,500 mg; vit. B6 - 1,500 mg; vit. B12 - 4,000 mg; Folic acid - 500 mg; calcium pantothenate - 4000 mg; biotin - 50 mg; inositol - 10,000; nicotinamide - 7,000; choline - 40,000 mg; cobalt - 10 mg; copper - 500 mg; iron - 5,000 mg; iodine - 50 mg; manganese - 1,500 mg; selenium - 10 mg; zinc - 5,000 mg.

Tabela 10: Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais (% do total ácidos graxos).

Ácidos graxos	Dietas experimentais						
	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7
16:00	11,56	10,81	11,01	9,29	9,80	7,95	8,57
18:00	4,87	5,51	5,14	5,08	5,46	5,40	5,45
20:00	0,54	0,54	0,46	0,42	0,43	0,44	0,38
22:00	0,63	0,59	0,51	0,44	0,45	0,43	0,31
24:00	0,26	0,26	0,28	0,22	0,22	0,23	0,24
18:1n-9	28,31	31,11	26,40	29,78	31,06	31,36	27,95
18:1n-7	1,49	1,42	1,05	1,15	1,13	1,12	0,69
20:1n-9	0,33	0,34	0,24	0,27	0,29	0,28	0,20
18:2n-6	46,58	37,69	36,67	30,17	29,44	27,80	19,44
18:3n-3	5,43	11,71	12,89	23,17	21,69	24,99	27,65
<sup>1</sup> ΣSat	17,85	17,72	17,40	15,46	16,37	14,45	14,95
<sup>2</sup> ΣMon	30,13	32,87	27,69	31,21	32,48	32,76	28,83
<sup>3</sup> ΣPol	52,01	49,41	49,55	53,34	51,13	52,79	47,09
n6/n3	8,57	3,22	2,85	1,30	1,36	1,11	0,70

<sup>1</sup>Soma dos ácidos graxos saturados; <sup>2</sup>Soma dos ácidos graxos monossaturados e <sup>3</sup>Soma dos ácidos poli-insaturados.

O óleo de milho foi utilizado para manter as dietas isoenergéticas. Os ingredientes foram triturados em moinho do tipo martelo com peneira de 0,3 mm de diâmetro. A ração foi processada de maneira extrusada (extrusora Ex-Micro®) com 1.0 mm de diâmetro. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (8h e 11h da manhã, e 14h e 17h da tarde) ate a saciedade aparente.

- Peixes e condições experimentais

Foram utilizados 420 zebrafish (*D. rerio*) machos com idade de 50 dias após a eclosão, com peso médio de  $0,29 \pm 0,04$  g e comprimento total médio de  $30,67 \pm 0,71$  mm. Os animais foram distribuídos em tanques de vidro com capacidade de 50 litros, dotados, individualmente, de filtro interno, termostato de 50 w e aeração constante por meio de um soprador de ar central.

A temperatura média da água, pH e oxigênio dissolvido foram de  $26,23 \pm 0,54$  °C,  $7,3 \pm 0,01$  e  $6,6 \pm 0,32$  mg L<sup>-1</sup>, permaneceu dentro da faixa ideal para espécie<sup>70</sup>.

- Coleta de dados

Ao final do experimento, os peixes foram eutanasiados (tricaína metanosulfato-MS-222, a 250 mg L<sup>-1</sup> por 10 minutos) para realização das medidas de peso (g) e comprimento (mm). Foi realizada a dissecação dos animais para retirada do fígado, utilizadas para análise de expressão gênica e análise de marcadores antioxidantes. Estas amostras de tecido foram armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido, em seguida transferidos para freezer a -80 °C.

- Desempenho produtivo

Os cálculos de desempenho produtivo foram:

- Taxa de sobrevivência:  $N_f$  (número de peixes final);  $N_i$  (número de peixe inicial).

$$TS\% = \frac{N_f * 100}{N_i}$$

- Ganho em peso:  $P_f$  (peso final);  $P_i$  (peso inicial).

$$GP = P_f - P_i$$

- Taxa de crescimento específico:  $\ln P_f$  (log natural do peso final);  $\ln P_i$  (log natural do peso inicial);  $N_d$  (número de dias do experimento).

$$TCE = \left[ \left( \frac{\ln P_f - \ln P_i}{N_d} \right) * 100 \right].$$

- Determinação in vitro da atividade antioxidante das dietas experimentais

A atividade antioxidante das dietas foi determinada através do ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de acordo com o procedimento de QUENCHER<sup>71</sup>.

- Composição dos ácidos graxos na deita e músculo de zebrafish

A composição dos ácidos graxos foi determinada de acordo com Figueiredo *et al.*<sup>72</sup>.

- Avaliação da atividade antioxidante e peroxidação lipídica

Foi utilizado para a análise um pool de 50 mg de fígado unidade experimental. A determinação da superóxido demutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase

(GPx), glutationa (GSH) e peroxidação lipídica (TBARS) foi realizada através de metodologias clássicas<sup>73,74,75,76, 77</sup>.

- Análises de expressão gênica

Para a análise de expressão gênica foi utilizado o fígado inteiro individualizado, sendo coletado cinco fígados de cada tratamento. O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Para avaliar a concentração total de RNA, as amostras foram mensuradas usando espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom). A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) e visualizado em aparelho transluminador com luz ultravioleta.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi confeccionado utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e RNA free foram adicionados 6 µl de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50 µM oligo (dT)20 e 1 µL de tampão de anelamento (Annealing buffer). A reação foi incubada por 5 minutos a 65 °C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Foi adicionado em seguida 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50 °C e posteriormente 5 minutos a 85°C, sendo imediatamente colocada sobre o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para avaliar por PCR em tempo real (qRT-PCR) os primers dos genes SREBP -2 (Sterol regulatory element-binding protein 2) e PPAR- $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ) foram desenhados de acordo com as sequências depositados no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para zebrafish (*Danio rerio*), utilizando o site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) (Tabela 11). Para controle endógeno, foi utilizado o gene da  $\beta$ -actina.

Para as reações de qRT-PCR, foi utilizado o corante fluorescente SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), conforme recomendações do fabricante. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas. As reações foram conduzidas em strips, no aparelho StepOne Plus. As concentrações de

primer e cDNA foram determinadas através de testes de eficiência utilizando três concentrações de primer (100, 200 e 400 nM) e quatro concentrações de cDNA (10, 100, 200 e 400 ng). O método  $2^{-\Delta CT}$  foi utilizado para as análises de quantificação relativa, sendo os dados expressos em unidade arbitrária (UA).

Tabela 11: Primers utilizados neste estudo.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)	Número de acesso
SREBP-2	F:GATGCTGGTATTGGTGGTTTATG R:AGTGTCTGTGTGTGAGAGATTG	149	NM_001089466.1
PPAR- $\alpha$	F:GAACCGAAACAAGTGCCAATAC R:GGATCTCTGCCTTCAACCTTAG	122	NM_001102567.1
$\beta$ -actina	F:CAAACGAACGACCAACCTAAAC R:TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	108	NM_131031.1

- Análise estatística

Os dados foram submetidos análise de variância fatorial. No caso de diferenças significativas foi realizado o teste de Tukey no desdobramento fatorial ao nível de 5% de probabilidade. O teste de Dunnett (nível de 5% de probabilidade) foi utilizado para comparação com o grupo controle. Os testes foram realizados no programa estatístico Statistical Analysis Software 9.3 (SAS, 9.3).

## Referências

1. Teitelbaum, J. E. & Walker, W. A. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J Nutr Biochem*, **12**, 21-32 (2001).
2. Souza, S. M. G., Anido, R. J. V. & Tognon, F. C. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Rev Nutr*, **6**, 63-71 (2007).
3. Sargent, J. G., Tocher, D. R. & Bell, J. G. The lipids. In: Halver, J. E. & Hardy, R. W. *Fish nutrition*. (3ªed. Ohio) 181-257 (Elsevier, 2002).
4. Popa, V. M. *et al.* Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) from Romania. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. **18**, 136-140 (2012).
5. Nayak, M., Pradhan, A., Samanta, M. & Giri, S. S. Dietary fish oil replacement by linseed oil: Effect on growth, nutrient utilization, tissue fatty acid composition and desaturase gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) fingerlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **205**, 1-12, (2017)
6. Kiron, V., Fukuda, H., Toshio, T.; Watanabe, T. Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **111**, 361-367 (1995).
7. Sotoudeh, E., Kenari, A. A., Khodabandeh, S. & Khajeh, K. Combination effects of dietary EPA and DHA plus alpha-tocopherol: effects on performance and physiological



- status of Caspian brown trout (*Salmon trutta caspius*) fry. *Aquacult Nutr*, **2**, 101-1115, (2015).
8. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (4<sup>o</sup> ed.) 851 (Oxford University Press, 2007).
9. Teixeira, B. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, **43**, 587-595 (2013).
10. Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S. & Endo T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull.* **48**, 1467-1469 (2000).
11. Gülçin, I., Elmastaş, M. & Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian J Chem*, **5**, 489-499 (2012).
12. Asimi, O. A. & Sahu, N. P. Effect of Antioxidant Rich Spices, Clove and Cardamom Extracts on the Metabolic Enzyme Activity of *Labeo rohita*. *J Fisheries Livest Prod*, **4**, 1-6 (2016).
13. Bergeron, S. *et al.* Expression profiling identifies novel Hh/Gli-regulated genes in developing zebrafish embryos. *Genomics*, **91**, 165-177 (2008).
14. Whipps, C.M., Murray, K.N. & Kent, M. L. Occurrence of a Myxozoan Parasite *Myxidium streisingeri* n. sp. in Laboratory Zebrafish *Danio rerio*. *J Parasitol*, **101**, 86-90 (2015).
15. Ulloa, P. E., Medrano, J. & Feijoo, C. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics*, **5**, 313-318, p. 2014.
16. Ribas, L. & Piferrer, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews Aquaculture*. **6**, 209-240 (2014).
17. Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, **269**, 1-20 (2007).
18. Sohilait, H. J. Chemical Composition of the Essential Oils in *Eugenia caryophyllata*, Thunb from Amboina Island. *Science Journal of Chemistry*, **3**, 95-99 (2015).
19. Jirovetz, L. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *J Agric Food Chem.* **54**, 6303 -6307 (2006).
20. Biondo, P. B. F. *et al.* Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds by gc-ms of essential oils from spices, herbs and citrus. *Current Bioactive Compounds*, **12**, 137-143 (2017).
21. Araújo, F. G. *et al.* Dietary oils influence ovary and carcass composition and embryonic development of zebrafish. *Aquacult. Nutr*, doi:10.1111/anu.12432 (2016).
22. Ikeda, A. K. *et al.* Vegetable oil sources in diets for freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*, Cichlidae): growth and thermal tolerance. *Ar Br Med Vet Zootec*, **63**, 670-677 (2011).
23. Meinelt, T., Schulz, C., Wirth, M., Kürzinger, H. & Steinberg, C. Correlation of diets high in n-6 polyunsaturated fatty acids with high growth rate in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Mend*, **50**, 43-45 (2000).
24. Jaya-Ram, A., Kuah, M., Lin, P., Kolkovski, S., Shu-Chien. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile end desaturase and elongase mRNA expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, **277**, 275-281, (2008).
25. Li, C., Liu, P., Ji, H., Huang, J. & Zhang, W. Dietary n-3 highly unsaturated fatty acids affect the biological and serum biochemical parameters, tissue fatty acid profile, antioxidation status and expression of lipid-metabolism-related genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquacult Nutr*, **21**, 373-383, 2015.
26. Zupan, B. *et al.* Common carp response to the different concentration of linseed oil in diet. *Slovenian Veterinary Research*, **53**, 19-28 (2016).

27. Benítez-Dorta, V. *et al.* Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish physiol biochem*, **39**, 335-349 (2013).
28. Ganorkar, P. M. & Jain, R. K. Flaxseed – a nutritional punch. *Inte Food Research J*, **20**, 519-525 (2013).
29. Fujibayashi, M., Ogino, M. & Nishimura, O. Fractionation of the stable carbon isotope ratio of essential fatty acids in zebrafish *Danio rerio* and mud snails *Bellamya chinensis*. *Oecologia*, **180**, 589-600 (2016).
30. Tocher, D. R. *et al.* Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol Biochem*, **29**, 309-320 (2001).
31. Liu, L., Su, J., Liang, X. F. & LUO, Y. Growth Performance, Body Lipid, Brood Amount, and Rearing Environment Response to Supplemental Neutral Phytase in Zebrafish (*Danio Rerio*) Diet. *Zebrafish*, **10**, 433-438 (2013).
32. Qiu, H. *et al.* Dietary Lipid Sources Influence Fatty Acid Composition in Tissue of Large Yellow Croaker (*Larmichthys crocea*) by Regulating Triacylglycerol Synthesis and Catabolism at the Transcriptional Level. *PLoS One*. **12**, 1-19 (2017).
33. Tocher, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater. *Aquacul Res*, **41**, 717-732 (2010).
34. Thomassen, M. S., Rein, D., Berge, G. M., Ostbye, T. & Ruyter, B. High dietary EPA does not inhibit  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets. *Aquaculture*, **360**, 78-8 (2012).
35. Glencross, B. D., Tocher, D. R., Matthew, C. & Bell, J. C. Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and fatty acid retention in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem*, **40**, 1213-1227 (2014).
36. Rosenlund, G., Torstensen, B. E., Stubhaug, I., Usman, N. & SISENER, N. Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *J Nutr Scienc*, **5**, 1-13 (2016).
37. Peng, S. *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on growth performance, lipid peroxidation and tissue fatty acid composition of black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fed oxidized fish oil. *Aquacult Nutr*, **15**, 329-337 (2009).
38. Food and Agriculture Organization (FAO). *Fats and fatty acids in human nutrition*. 166 (Geneva, 2010).
39. Dabrowski, K. & M.C. Portela. Feeding plasticity and nutritional physiology in tropical fishes, 155-224. In: Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. & Randall, D. J. (Eds). *The Physiology of Tropical Fishes*. 634 (San Diego, 2006).
40. Tonial, I. B. *et al.* Optimization of flaxseed oil feeding time length in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a function of muscle omega-3 fatty acids composition. *Aquacul Nutr*, **15**, 564-568 (2009).
41. Bartoskova, M. *et al.* Norfloxacin-Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. *Biomed Res Int*, **2014**, 1-6 (2014).
42. Affonso, R. S., Rennó, M. N., Slana, G. B. C. A. & França, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Rev Virtual Quim*, **4**, 146-161 (2012).
43. Galvão, L. E., Silva, D. C., Silva, J. O., Moreira, A. V. & Sousa, E. M. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc Tecnol Aliment.*, **28**, 551-557 (2008).

44. Siger, A., Nogala, M. & Lampart-Szczapa, E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids*, **15**, 137-149 (2008).
45. Elia, A. C., Anastasi, V. & Dörr, A. J. M., Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid for superficial water potabilization. *Chemosphere*, **64**, 1633-1641 (2006).
46. Hou, J., Li, L., Xue, T., Long, M., Su, Y., Wu, N. Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. *Chemosphere*, **120**, 729-736 (2015).
47. Kiron, V., Thawonsuwan, J., Panigrahi, A., Scharsack, J. P. & Satoh, S. Antioxidant and immune defences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquacult Nutr*, **17**, 130-140 (2011).
48. Kaushik, S. & Kaur, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta*, **333**, 69-77 (2003).
49. Deng, Q. *et al.* Effect of flaxseed oil fortified with vitamin e and phytosterols on antioxidant defense capacities and lipids profile in rats. *J Food Sci*, **77**, 135-140 (2012).
50. Michalik, L. *et al.* International union of pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 726-741 (2006).
51. Kamalam, B. S., Medele, F., Larroquet, L., Corraze, G., Panserat, S. Metabolism and fatty acid profile in fat and lean rainbow trout lines fed with vegetable oil: effect of carbohydrates. *PLoS One*, **8**, 1-16 (2013).
52. JIN, M. *et al.* Regulation of growth, antioxidant capacity, fatty acid profiles, hematological characteristics and expression of lipid related genes by different dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture*, **471**, 55-65 (2017).
53. Dong, X. *et al.* Regulation of FADS2 transcription by SREBP-1 and PPAR- $\alpha$  influences LC-PUFA biosynthesis in fish. *Scient Reports*, **7**, 1-11 (2017).
54. Yessoufou, A. A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha modulates insulin gene transcription factors and inflammation in adipose tissues in mice. *Mol Cell Biochem*, **323**, 101-111 (2009).
55. Walczak, R. & Tontonoz, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR $\gamma$  in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res*, **43**, 177-186 (2002).
56. Lu, K. *et al.* Hepatic  $\beta$ -oxidation and regulation of carnitine palmitoyl transferase (CPT) in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet. *PLoS One*, **9**, 1-12 (2014).
57. Yoon, M. The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions. *Pharmacol Res*, **60**, 151-159 (2009).
58. Lu, K. *et al.* Hepatic  $\beta$ -oxidation and regulation of carnitine palmitoyl transferase (CPT) in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* Fed a High Fat Diet. *PLoS One*, **9**, 1-12 (2014).
59. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, **50**, 1-14, (2006).
60. Sato, R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys*, **501**, 177-181, (2010).
61. Bengoechea-Alonso, M. T. & Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 215-22 (2007)
62. Tocher, D. R., Bendiken, E. A., Campbell, P. J. & BELL, J. G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, **280**, 21-34 (2008).

63. Phillips, K. M., Ruggio, D., Toivo, J., Swank, M. A. & Simpkins, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J Food Composit Anal*, **15**, 123-142, (2002).
64. Ostlund, R. E. Phytosterols and cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*, **15**, 37-41, (2004).
65. Castro, C. *et al.* Regulation of glucose and lipid metabolism by dietary carbohydrate levels and lipid sources in gilthead sea bream juveniles. *Br J Nutr*. **116**, 19-34 (2016).
66. Leaver, M. J. *et al.* Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genomics*, **9**: 299 (2008).
67. Siccardi, A. J. *et al.* Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*. **6**, 275-280 (2009).
68. Westerfield, M. *The Zebrafish Book, A Guide for the laboratory use of zebrafish (Danio Rerio)* (5<sup>o</sup> ed. Eugene) (Oregon, 2007).
69. Serpen, A., Gökmen, V. & Fogliano, V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meas. *Meat Science*, **90**, 60-65 (2012).
70. Figueiredo, I. *et al.* Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. *J Chromatogr A*. **1456**, 235-241. 2016.
71. Hissin, P. J. & Hilf. R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal Biochem*, **74**, 214-226 (1976).
72. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**, 121-126 (1984).
74. Paglia, D. E. & Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Laboratory and Clinical Medi*, **70**, 158-169 (1967).
75. Marklund, S. & Marklund. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. **16**, 469-74 (1974).
76. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi. K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal Biochem*, **95**, 351-358 (1979).