

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Câmpus de Botucatu

Avaliação da capacidade antioxidante e do desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo
alimentada com concentrado de melão

WILLIAM DOS SANTOS XAVIER

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção ao título
de Mestre

BOTUCATU – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Câmpus de Botucatu

Avaliação da capacidade antioxidante e do desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo
alimentada com concentrado de melão

WILLIAM DOS SANTOS XAVIER

Zootecnista

ORIENTADORA: Prof^ª. Ass. Dra. Margarida Maria Barros

COORIENTADOR: Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção ao título
de Mestre

BOTUCATU – SP

JUNHO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Xavier, William dos Santos.

Avaliação da capacidade antioxidante e do desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo alimentada com concentrado de melão / William dos Santos Xavier. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Margarida Maria Barros

Coorientador: Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho

Capes: 50403010

1. Aditivos alimentares. 2. Estresse oxidativo. 3. Tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: Aditivos; Estresse em peixe; Estresse oxidativo; *Oreochromis niloticus*; Perfil hematológico.

BIOGRAFIA

William dos Santos Xavier, filho de Valdemir Xavier Gomes e Quitéria Maria dos Santos Xavier, nasceu no município de Canhotinho, Pernambuco, no dia 04 de setembro de 1993.

Ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns em março de 2012, concluindo-o em 15 de fevereiro de 2017.

No mesmo ano, ingressou no mestrado em Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista “*Júlio de Mesquita Filho*”, câmpus de Botucatu, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Saúde de Peixes, buscando investigar a capacidade antioxidante e o desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo alimentada com extrato de melão liofilizado.

No dia 07 de junho de 2019, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

“Cultivar morada em sentimentos nobres,
semear memórias belas pelo mundo e voltar
mais forte de todas as batalhas”.

(Autor desconhecido)

Aos

Meus pais, Valdemir Xavier Gomes e Quitéria Maria dos Santos Xavier por todo amor, dedicação e incentivo, por serem essenciais nessa conquista e em minha vida.

À

Minha irmã, Williani dos Santos Xavier por todo carinho, amor e respeito. Te amo minha irmã!!

Ao

Meu avô, João Correia dos Santos, verdadeiro herói, exemplo de vida, por todo seu amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido que eu continuasse minha jornada e por ter me dado sabedoria e força, mostrando que sou capaz de conquistar os meus objetivos.

Aos meus pais Quitéria Maria dos Santos Xavier e Valdemir Xavier Gomes, pelo amor, apoio, todos os esforços por eles realizados e por toda sua dedicação. Por tudo sempre! Amo vocês!!!

A minha orientadora, Profa. Ass. Dra. Margarida Maria Barros, por ter me acolhido como membro de sua equipe, por todo aprendizado, confiança e contribuições que não se limitaram ao conhecimento científico-acadêmico, mas à vida como um todo. Tenho muito orgulho de ter o nome BARROS associado ao meu nome.

Ao meu coorientador Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, por toda dedicação, motivação e incentivo, com quem tive a oportunidade de compartilhar e aprender novas experiências.

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, por também ter me acolhido como membro de sua equipe, por todo aprendizado, por ser um grande exemplo de pessoa e profissional.

A Profa. Luciana Francisco Fleuri, por todo aprendizado durante o curso o qual não se limitou apenas em suas disciplinas, me recebendo muito bem em seu departamento quando precisava.

Aos amigos do grupo AquaNutri, (Edgar Damasceno, Hinglidj Muller, Igor Simões, Matheus Gardim, Paulo Ito e Pedro Pucci), por terem me acolhido como membro dessa família, por todo apoio, compreensão, momentos maravilhosos vividos ao lado de vocês!!! Meu eterno obrigado, sem vocês nada disso seria possível! Em especial gostaria de agradecer ao Igor Simões, o qual me recebeu em sua casa de braços abertos, sendo um

porto em vários momentos... e por dividir comigo o chão da nossa sagrada casa! Axé irmão, que o nosso Pai Oxalá abençoe seus caminhos eternamente!!!

Aos que fazem parte da turma de Mestrado 2017.1 (Armando Contin, João Paulo, Mariana Rodrigues e Silvia Letícia,) por dividir as alegrias e as aflições, por acreditarem que a conquista de um é a conquista de todos.

Aos amigos que fiz durante o curso Carlos Alves, Carol Massucci, Tiago Dias, Luciana Spera, Eliana Cristina, Guilherme Barbosa, Evelyn Prestes, Gabriela Maria, Jéssica Cruvinel, Julianna Batistioli, Rafael Fogaça, Leonardo Zanetti e Magda Poletti, pelos bons e maus momentos aqui vividos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – PPGZOO, pela minha formação, especificamente ao Prof. Dr. José Roberto Sartori coordenador da atual gestão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 131553/2017-8), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2017/13217-9), pela bolsa concedida.

À empresa Lallemand Animal Nutrition, pelo apoio financeiro e por ceder o produto estudado.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Câmpus de Botucatu, por ter sido minha nova casa e ter me acolhido nessa cidade agradável de clima “louco”!

Anyway, o meu MUITO OBRIGADO a todos!!!

SUMÁRIO

RESUMO	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
CAPÍTULO I	
1. Alimentos funcionais	4
2. Melão como agente antioxidante	6
3. Sistema antioxidante.....	9
3.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)	10
3.2 Catalase (EC 1.11.1.6)	12
3.3 Glutationa peroxidase (EC 1.11.1.9) e glutaciona redutase (EC 1.6.4.2).....	13
4. Biomarcadores de estresse oxidativo	14
4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA)	15
5. Estresse em peixes	16
6. Perfil hematológico em peixes.....	16
7. Referências.....	18
CAPÍTULO II	
GRAPHICAL ABSTRACT	24
ABSTRACT	24
1. Introduction	25
2. Material and methods	27
2.1. <i>Experimental diets</i>	28
2.2. <i>Feeding trial (Phase I)</i>	28
2.3. <i>Heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS) (Phase II)</i>	29
2.4. <i>Hematological assay (Phase I and II)</i>	30
2.5. <i>Antioxidant enzyme activity (Phase I and II)</i>	31
2.6. <i>Superoxide radical scavenging activity, DPPH and FRAP in diets</i>	32

2.7. Determination of total phenols (TP) and total flavonoids (TF) in diets.....	33
2.8. Fillet lipid oxidation (Phase I and II).....	33
2.9. Statistical analysis	34
2.10. Ethics statement	34
3. Results	35
3.1. Growth performance	35
3.2. Hematological parameters before and after HDOIS	35
3.3. Leukogram before and after HDOIS	36
3.4. Liver antioxidant enzymes activity before and after HDOIS.....	36
4. Discussion.....	37
5. Acknowledgments	43
6. References.....	43
CAPÍTULO III	
Implicações.....	60

FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Obtenção do produto a partir do processamento da polpa e suco da fruta.....	8
Figura 2. Mecanismos de ação das defesas antioxidantes frente aos desequilíbrios causados pela formação de espécies reativas ao oxigênio.....	11
Figura 3. Reação enzimática da catalase.....	12
Figura 4. Mecanismo de ação da glutathione peroxidase na redução do H ₂ O ₂ e ação da glutathione reductase na recuperação da glutathione.....	13

Capítulo II

Figure 1. Superoxide anion radical scavenging activity in diets for juveniles Nile tilapia.....	57
---	----

Figure 2. Activity superoxide dismutase in diets for juveniles Nile tilapia.....	58
--	----

TABELAS

Capítulo II

Table 1. Formulation and chemical composition of the experimental diets.....	51
Table 2. Initial body weight (IBW), final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FRC), specific growth rate (SGR), survival (SUR) of Nile tilapia fed diets containing levels of melon pulp concentrate for 60 days.....	52
Table 3. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of melon pulp concentrate for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.....	53
Table 4. Total plasm albumin:globulin ratio (A:G) and serum Glucose (GLU) of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress	54
Table 5. Lymphocyte (Lymp), neutrophil (Neutr), and monocyte (Mon) counts of Nile tilapia fed diet containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress	55
Table 6. Liver antioxidant enzymes activity and malondialdehyde production on fillet of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.....	56

RESUMO

Avaliação da capacidade antioxidante e do desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo alimentada com concentrado de melão

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do concentrado de melão rico em SOD (superóxido dismutase) sobre o desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade das enzimas antioxidantes da tilápia-do-Nilo submetidas a desafio por estresse térmico e hipóxia. Um grupo de 462 tilápias revertidas sexualmente ($8,87 \text{ g} \pm 0,12$) foi distribuído aleatoriamente em 42 aquários de 250 L (11 peixes/aquário) e alimentado com sete dietas práticas contendo níveis de concentrado de melão 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0% por 60 dias. As dietas foram formuladas para conter 29% de proteína digestível e 18 MJ de energia digestível kg^{-1} . Após 60 dias de alimentação, determinou-se o desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e atividade das enzimas do sistema antioxidante. Em seguida, os peixes foram submetidos a desafio térmico e hipóxia ($34^\circ\text{C}/1,87 \text{ mg/L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido) por dois dias e os mesmos parâmetros hematológicos e atividade de enzimas do sistema antioxidantes foram determinados após esse período. No presente estudo, o concentrado de melão foi capaz de manter a eritropoiese e a capacidade antioxidante sob estresse térmico e hipóxia, porém não houve efeito no desempenho produtivo. A concentração de malonaldeído presente no filé de peixes alimentados com dietas suplementadas com concentrado de melão diminuiu 1,5 vezes após o estresse. Os resultados do presente estudo sugerem o nível de suplementação entre 0,4 e 0,5% de concentrado de melão capaz de manter a saúde dos animais após desafio.

Palavras-chave: Aditivos, perfil hematológico, estresse oxidativo, *Oreochromis niloticus*, estresse em peixe.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O **Capítulo I** trata-se de breve abordagem sobre o uso de alimentos funcionais em dietas para peixes, os quais, nos últimos anos, após a restrição de antibióticos têm sido comumente estudados buscando minimizar os efeitos impostos na produção. Dentre as consequências fisiológicas descritas em função do sistema intensivo de produção, o estresse oxidativo tem demonstrado prejudicar o desempenho produtivo, deprimir o sistema imunológico e interferir no bem-estar dos animais. Desta forma, o uso de aditivos naturais vem sendo utilizado para minimizar os efeitos causados por danos oxidativos e por uso de fármacos. Mecanismos de ação benéfica têm sido propostos para estes aditivos, os quais podem favorecer a absorção e digestão dos nutrientes, modulação imunológica e ação antioxidante. Dentre os aditivos alternativos apresenta-se o concentrado do melão, produto obtido a partir do processamento da polpa e suco.

Com base nas informações apresentadas no Capítulo I, o **Capítulo II** foi redigido com objetivo de verificar os efeitos da inclusão do concentrado de polpa de melão na ração da tilápia-do-Nilo, capítulo intitulado: “The putative effect of a SOD-rich melon pulp concentrate on growth performance and antioxidant status of Nile tilapia under heat/dissolved oxygen-induced stress”, o qual foi redigido de acordo com as normas do periódico **Aquaculture** (fator de impacto 2.710).

Capítulo I

1. Alimentos funcionais

Alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles que, além de cumprirem sua função nutricional básica, fornecem um ou mais benefícios para a saúde, como prevenção e/ou tratamento de doenças (MAHMOUDI et al., 2015). Podem ser obtidos a partir de alimentos que já contenham substâncias naturalmente bioativas (por exemplo, fibras alimentares), alimentos enriquecidos com compostos bioativos (probióticos e antioxidantes), e nutrientes derivados de certos alimentos que serão enriquecidos em outros alimentos convencionais (prebióticos) (SILVA et al., 2016).

A utilização de alimentos funcionais como aditivo na nutrição animal vem sendo fortemente encorajada. São considerados como alternativa ao uso dos antibióticos e quimioterápicos, pois podem reduzir o impacto ambiental, melhorar a rentabilidade e valorizar subprodutos agrícolas (SILVA et al., 2013; THANIGAIVEL et al., 2016).

Aditivos funcionais são fornecidos em pequenas quantidades nas dietas; no entanto, eles são capazes de melhorar as características dos alimentos, a saúde e a produção animal (ROSEN, 1997). Entre esses aditivos, os antioxidantes são considerados agentes de proteção que inibem ou retardam o início da oxidação induzida por espécies reativas ao oxigênio (EROs), sendo eles os radicais superóxido, hidroperoxila, hidroxila, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete (PISOCHI e POP, 2015).

Nesse contexto, pesquisas com o uso de alimentos funcionais com potencial antioxidante na nutrição de peixes foram realizadas com objetivo de avaliar o desempenho, saúde e capacidade antioxidante destes aditivos (MAHMOUND et al., 2017; ZAHRAN et al., 2018; BELTRAN et al., 2018; GUARDIOLA et al., 2018; YILMAZ, 2019; VICENTE et al., 2019).

Vicente et al. (2019) avaliaram a capacidade antioxidante do fragmento da casca de laranja como potencial aditivo na nutrição e saúde da tilapia-do-Nilo submetidos à hipóxia e alta temperatura. Os autores observaram manutenção do perfil hematológico e melhora da capacidade antioxidante dos peixes submetidos ao estresse induzido por três dias, sendo que os resultados sugerem a suplementação dietética entre 0,63 – 0,68% do fragmento de casca de casca de laranja na dieta. Ylmaz (2019) observou os efeitos do xarope de amora preta em tilápias alimentadas durante 90 dias, com base nos resultados, a suplementação dietética do xarope de amora preta melhorou o desempenho produtivo, a capacidade antioxidante e foi observado maior sobrevivência dos peixes desafiados por *Plesiomonas shigelloides* durante 20 dias, o autor sugeriu o nível de 15g kg⁻¹ de suplementação de amora preta. Araújo et al. (2017) avaliaram o efeito funcional do plasma sanguíneo suíno seco por spray na nutrição e saúde da tilapia-do-Nilo submetidas ao estresse a frio por sete dias. Com base nos resultados encontrados, a suplementação dietética melhorou o desempenho produtivo no período de 60 dias, a saúde intestinal e manteve o perfil hematológico, sendo que os resultados sugerem nível de suplementação de 51.83 g kg⁻¹. Em estudo realizado com cúrcuma (*Curcuma longa*), os autores observaram que a suplementação dietética de 50 mg kg⁻¹ promoveu efeitos positivos no desempenho produtivo, na eficiência de uso dos alimentos, na função imune, na capacidade antioxidante e resistência a doenças, sendo este alimento funcional promissor na melhora da saúde de peixes (MAHMOUD et al., 2017).

Aditivos alternativos apresentam-se, também, como alternativa em dietas, visando a máxima saúde, principalmente, sob condição de desafio e estresse, podendo ser fornecido de forma diferenciada na dieta com o objetivo de proporcionar melhor eficiência. Dentre os aditivos alternativos apresenta-se o extrato do melão, que é naturalmente rico em antioxidantes, principalmente a enzima superóxido dismutase

(SOD), vitaminas dos tipos A, B1, B2, B6, C e E, e minerais como o potássio. Possui ação anticoagulante, podendo também reduzir o risco de câncer e doenças cardiovasculares, como descrito para humanos (LESTER, 1996; ZEB, 2016). Entretanto, os resultados do uso do extrato do melão liofilizado na nutrição animal ainda são restritos a poucas pesquisas com hamsters, aves (CARILLON et al., 2014; CARILLON et al., 2016) e humanos (VOULDOUKIS et al., 2004; MILIND e KULWANT, 2011; CARILLON et al., 2012) necessitando ser atestado na nutrição de tilápia sob condições de desafio.

2. Melão como agente antioxidante

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família das cucurbitáceas, nativa do oriente médio, possui características nutritivas e medicinais como, tratamento de distúrbios cardiovasculares, estomacal e vermífugo (MILIND e KULWANT, 2011), além de ação antioxidante, anti-inflamatória (VOULDOUKIS et al., 2004) e potencial inibidor de urease (MALHOTRA e RANI, 1978). A casca da fruta possui compostos polifenólicos, ácidos orgânicos e outros compostos polares biologicamente ativos que têm propriedades que melhoram a saúde (MOON e SHIBAMOTO, 2009).

A produção de melão, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE foi cerca de 596 430 mil toneladas no ano de 2016. Os três principais estados produtores da fruta, em ordem decrescente por área plantada, são: Rio Grande do Norte, Ceará e São Paulo. A Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP comercializa, ano a ano, cerca de 15% desta produção. Segundo o IBGE 2016, o Brasil ocupa a 8ª posição no ranking internacional de exportação do fruto, sendo que dentre os produtos gerados a partir do processamento da fruta, tem-se a polpa e o suco de

melão. A polpa é o produto não fermentado e não diluído submetido ao processamento tecnológico, obtido da parte comestível da fruta, enquanto que o suco é a bebida não concentrada e não diluída adquirida do melão fresco, maduro e saudável (BRASIL, 2000; FRUTAS E DERIVADOS, 2007).

O extrato de melão liofilizado é o produto obtido a partir do processamento da polpa e suco da fruta (Fig. 1). O produto é naturalmente rico em enzimas do sistema antioxidante como a superóxido dismutase e catalase. Este produto resultante é liofilizado e microencapsulado, possibilitando efeito protetor sobre seus nutrientes e propriedades químicas. O produto utilizado no estudo é fabricado pela Lallemand Animal Nutrition, com sede na França a partir da variedade proprietária de melão (*Cucumis melo var. cantalupensis*) não transgênica, contendo níveis garantidos de SOD de 2.6 UI SOD/mg do produto.

O produto apresenta como veículo o trigo, o qual é rico em gliadina, proteína monomérica responsável por possuir capacidade elástica, capaz de proteger a SOD durante o processo de digestão (VOULDOUKIS et al., 2004). O processo de absorção da gliadina acontece no epitélio intestinal. A passagem da gliadina pelo epitélio ocorre por meio da interação gliadina e receptores CXCR3. A presença da gliadina, aumenta a permeabilidade intestinal nas junções intercelulares, o que facilita a absorção de outras biomoléculas, como por exemplo, a superóxido dismutase. A combinação do concentrado de melão com o trigo, aumenta as chances de absorção da enzima, além de garantir característica sustentável, uma vez que, a gliadina age como biopolímero natural (LAMMERS et al. 2008).



Fig. 1. Produto obtido a partir do método de liofilização da polpa e suco do melão (var. *cantalupensis*) contendo superóxido dismutase (SOD) em sua composição. Arquivo pessoal.

Além da produção de frutas para o consumo e exportação, atualmente pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar o uso de aditivos alternativos na nutrição animal e, assim, se faz favorável a utilização do melão, já que tem apresentado potencial de utilização para este fim considerando seu valor nutricional. Os estudos desenvolvidos avaliaram a eficiência da ação antioxidante do extrato de melão na nutrição e saúde animal confirmando sua ação antioxidante (CARILLON et al., 2014; CARILLON et al., 2016).

Em estudo realizado com o extrato de melão, os pesquisadores observaram redução do tecido adiposo em hamsters obesos, uma vez que a administração do extrato rico em antioxidantes ativou a lipólise nos adipócitos, reduzindo o seu tamanho (CARILLON et al., 2014). A ação do extrato aumentou a expressão das enzimas antioxidantes e, portanto, reduziu o estresse oxidativo e a resistência à insulina, corroborando os resultados observados por Décordé et al. (2009) e Carillon et al. (2013), com hamsters e aves de postura, respectivamente.

O aumento das defesas antioxidantes endógenas no oviduto das aves após serem alimentadas com dietas suplementadas com o extrato de melão, com melhora das características da qualidade do ovo foi observado por Carillon et al. (2016). Dentre os vários parâmetros que poderiam estar envolvidos na melhora da qualidade do ovo está a diminuição do estresse oxidativo, uma vez que este pode ser aumentado por diferentes condições de estresse, tais como altas temperaturas, ventilação inadequada do ambiente, micotoxinas, compostos tóxicos na ração ou doenças nas aves.

As respostas positivas demonstradas nas pesquisas com hamsters e aves de postura, no que tange a melhora da capacidade antioxidante e, por consequência, saúde animal suscitou o interesse desta pesquisa com tilápia-do-Nilo.

3. Sistema antioxidante

O metabolismo oxidativo tem como função a produção de energia necessária para as atividades celulares essenciais. Porém, o processo gera radicais livres os quais resultam de metabolismo normal, e que se não forem controlados, podem provocar danos nas células (ABATE et al., 1990; ARCHER et al., 1994). Segundo Sies (1993), o estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre as quantidades de radicais livres geradas e as quantidades de compostos antioxidantes existentes.

Os antioxidantes possuem papel fundamental nesse processo oxidativo, sendo responsáveis por impedir a lise celular gerada pela formação dos radicais livres. Impedem que os produtos oriundos da metabolização do oxigênio se combinem com moléculas suscetíveis e espécies ativas de oxigênio, formando compostos menos reativos (GOTTLIEB et al., 2009). O organismo possui enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase que reagem com os compostos oxidantes,

protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo e são responsáveis pela contenção da toxicidade do oxigênio (AHMAD, 1995).

Alguns alimentos como frutos e vegetais são fontes de antioxidantes exógenos que podem atuar em conjunto na proteção das células e tecidos (JACOB, 1995; NIKI et al., 1995; HERCBERG et al., 1998). Dentre os antioxidantes, vitaminas C e E, licopeno, luteína, ubiquinona, glutathione, polifenóis (flavonóides), carotenóides, resveratrol e N-acetilcisteína, os quais, retardam a absorção de antioxidantes endógenos, para que o balanço oxidativo permaneça em equilíbrio. Portanto, os compostos antioxidantes são importantes para a manutenção da vida e merecem destaque para que haja a preservação da saúde e produção animal.

3.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável por neutralizar o ânion superóxido (O_2^-) produzido no citosol, mitocôndria e retículo endoplasmático das células. Porém, a neutralização do ânion superóxido produz compostos nocivos aos organismos vivos, como exemplo desses compostos podemos destacar: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), sendo o radical hidroxila biologicamente o mais crítico ao organismo (MCCORD, 2000). Para a remoção do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila faz-se necessária a ação de outras enzimas do sistema antioxidante, a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) (NORDMANN e RIBIÈRE, 1991) (Fig. 2).

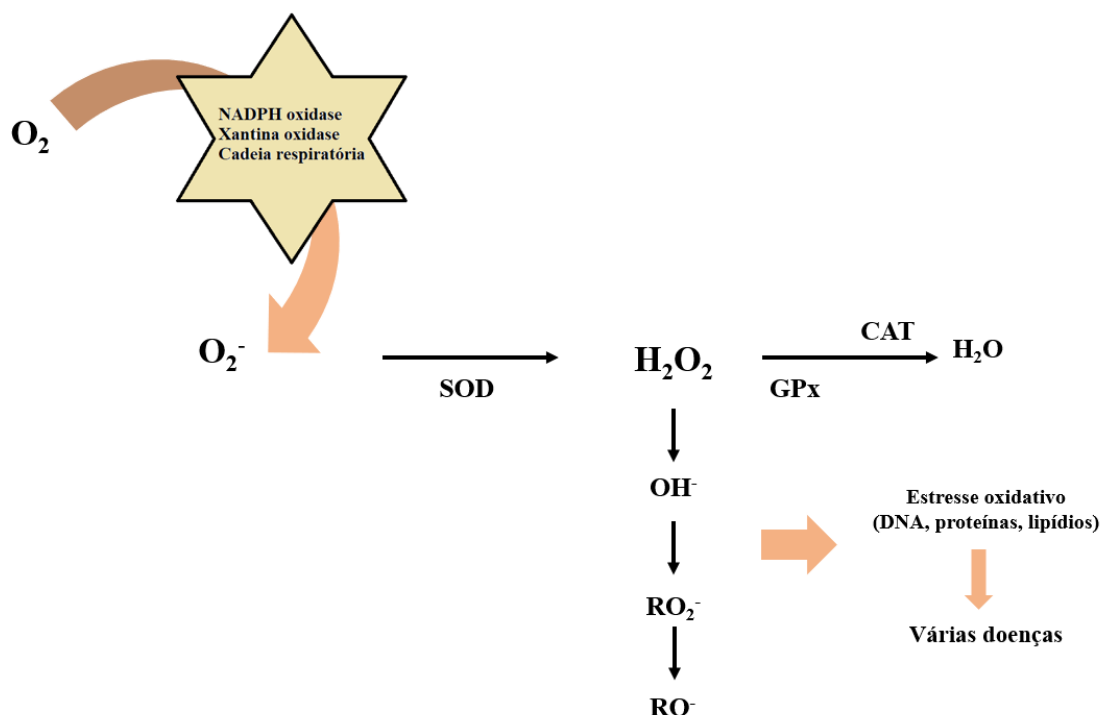


Fig. 2. Mecanismos de ação das enzimas antioxidantes, superóxido (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), frente aos desequilíbrios causados pela formação de espécies reativas ao oxigênio (O_2^-). R (Adaptado de Carillon et al., 2013).

A SOD foi descoberta em 1968, sendo que os pesquisadores McCord e Fridovich identificaram-na em eritrócitos de bovinos, os quais questionaram o que poderia dissociar o ânion superóxido produzido pela xantina oxidase em oxigênio e peróxido de hidrogênio (NORDMANN e RIBIÈR 1991). Hoje, várias formas comuns de SOD são encontradas: ligadas ao cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), que se localizam no citosol, manganês (Mn-SOD), na mitocôndria (membrana externa e matriz) e ferro (Fe-SOD) encontrada em algumas bactérias.

Atualmente a SOD exógena enriquecida na dieta têm sido objeto de estudo em animais, o que pode ser considerada estratégia preventiva e eficaz no combate e controle das principais doenças ligadas aos sistemas de defesa do organismo (CARILLON et al., 2013). Estudos têm demonstrado melhora na saúde de animais quando arraçoados com

dietas suplementadas com SOD exógena (EPPERLY et al., 2005; GREENBERGER et al., 2007).

Pesquisa com ratos alimentados com dietas enriquecidas com extrato de melão liofilizado demonstrou diminuição em danos gerados aos hepatócitos e resistência à hemólise induzida de glóbulos vermelhos (VOULDOUKIS et al., 2004). Notin et al. (2010) também demonstraram que a suplementação oral de SOD de melão aumentou a resistência à hemólise de cavalos em treinamento.

O desequilíbrio na razão de superóxido dismutase/catalase e glutathione peroxidase pode estar envolvido, também, no surgimento de doenças (VOULDOUKIS et al., 2004). Isto demonstra que a defesa antioxidante envolve, não apenas SOD endógena e exógena, mas também a ação equilibrada das enzimas em conjunto.

3.2 Catalase (EC 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam o oxigênio; está localizada principalmente nos peroxissomos, porém ausente nas mitocôndrias das células de mamíferos, a única exceção são as mitocôndrias presentes no coração dos ratos. É dependente de manganês (Mn) e ferro (Fe) para a sua atuação, a qual catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas de água (H_2O) e uma de oxigênio (O_2) (IGHODARO e AKINLOYE, 2018) (Fig. 3).

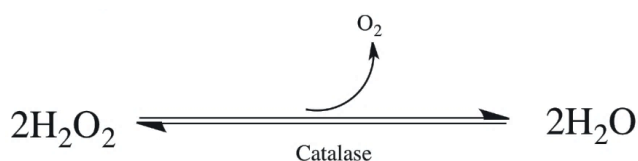


Fig. 3. Reação enzimática da catalase. Adaptado de Ighodaro e Akinloye, 2018.

3.3 Glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9) e glutathiona redutase (EC 1.6.4.2)

A glutathiona peroxidase (GPx) é encontrada em muitos tecidos de origem animal, sendo sua atividade enzimática um dos meios de controle dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, provenientes do ataque de espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2008). Como característica importante, apresenta um resíduo de cisteína que contém selênio covalente ligado ao restante da enzima. Sua atividade enzimática é dependente da glutathiona reduzida, como substrato. Após exposição da glutathiona reduzida às espécies reativas, ocorre sua oxidação à glutathiona oxidada, via glutathiona oxidase, a qual libera peróxido de hidrogênio. A glutathiona peroxidase catalisa a redução do peróxido, à custa da conversão da glutathiona reduzida a glutathiona oxidada. (Fig. 4.).

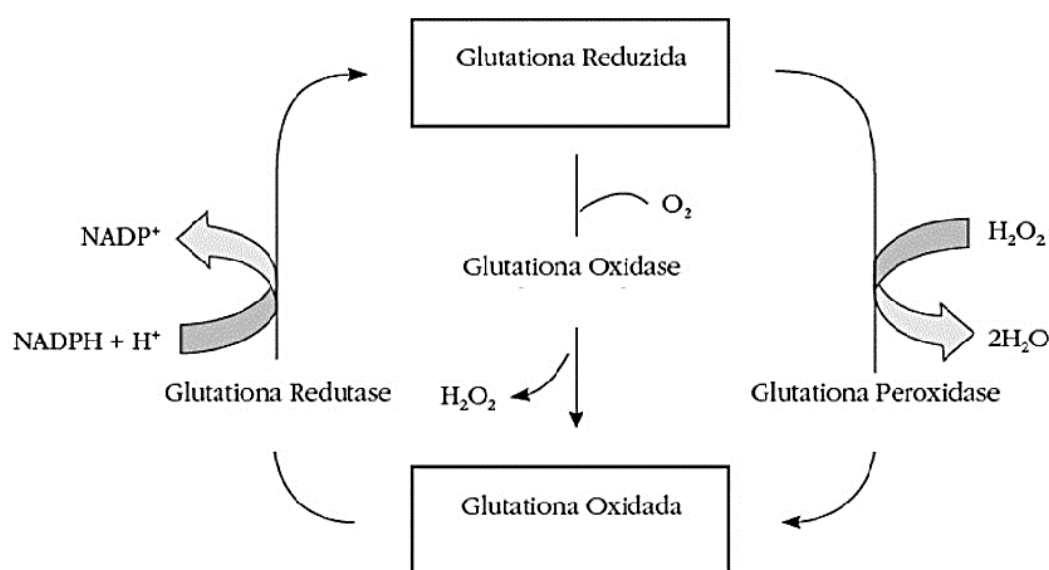


Fig. 4. Mecanismo de ação da glutathiona peroxidase na redução do H₂O₂ e ação da glutathiona redutase na recuperação da glutathiona. Adaptado de Barbosa et al. (2008).

A glutathiona redutase (GR) é a enzima que age em conjunto com a glutathiona peroxidase, porém com ação indireta na remoção de espécies reativas. É responsável pela

regeneração da glutatona à sua forma reduzida na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (BARBOSA et al., 2008).

4. Biomarcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio causado entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante, que resulta no acúmulo de produtos oxidativos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Tal processo conduz à oxidação das principais biomoléculas responsáveis pela homeostase celular: proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (PISOCHI e POP, 2015).

Os danos gerados a partir do estresse oxidativo podem comprometer células e tecidos, cuja a cronicidade do processo tem como consequência o desenvolvimento de enfermidades, entre elas a diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (MAYNE, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; OLIVARES-CORICHI et al., 2006; GALILI et al., 2007; MAIESE; MORHAN; CHONG, 2007).

O conhecimento das principais técnicas utilizadas para a identificação e quantificação dos danos causados pela ação do estresse oxidativo têm como objetivo sistematizar a utilização no diagnóstico, prevenção e controle dos efeitos gerados pelas principais enfermidades. Algumas dessas técnicas, também chamadas de biomarcadores, baseiam-se na oxidação das principais biomoléculas, sendo os lipídeos os mais amplamente estudados (MAYNE, 2003; VINCENT, 2007). Uma das técnicas na quantificação dos danos oxidativos em lipídios consiste em mensurar, por meio de métodos colorimétricos, as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (LIU et al., 1997).

Já os biomarcadores baseados no dano oxidativo das proteínas têm relevância em função de suas implicações: alteração funcional de enzimas, receptores, proteínas transportadoras, resposta imune, entre outros. Por meio de tais alterações, os produtos decorrentes do dano oxidativo sobre as proteínas podem contribuir para a geração de danos secundários a outras biomoléculas, que depende da sua estrutura intacta para realizar suas funções (PISOCHI e POP, 2015).

4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA)

Os aldeídos são substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lipídios. Dentre estes compostos, o malonaldeído é um dos mais abundantes, resultante da peroxidação lipídica tecidual, principalmente dos ácidos graxos araquidônico (AA, C20:4), eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6). Para a sua dosagem são empregados métodos colorimétricos, como no teste do TBA, sendo que em tal teste uma molécula de malondialdeído reage com duas de TBA.

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malonaldeído, reagindo com ampla variedade de compostos, entre eles, outros aldeídos, açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances – TBARS) (MAYNE, 2003; GROTTTO et al., 2007). O teste de TBARS apresenta ampla aplicação devido, especialmente, à sua facilidade de execução e baixo custo.

5. Estresse em peixes

Segundo Wendeelar-Bonga (1997), o estresse em peixes pode ser definido como a condição em que a homeostase é ameaçada ou perturbada em decorrência da ação de agentes estressores. Os agentes estressores podem ser classificados em agentes físicos, como por exemplo: práticas de manejo, transporte e altas densidades de estocagem, e agentes químicos, tais como: oscilação da temperatura, baixa saturação de oxigênio, oscilações do pH e contaminantes estendendo-se até aos estressores de origem biológica, como a presença de predadores (BARTON, 1997).

Desse modo, os animais precisam encontrar meios de lidar com os desafios a fim de confrontá-los e de superá-los, para garantir sua sobrevivência e seu potencial frente à produção animal. O conjunto das mudanças fisiológicas desencadeadas quando o peixe reage a desafios químicos, físicos e biológicos mais a tentativa de compensação são comumente referidos como respostas ao estresse (WEDEMEYER et al., 1990).

Portanto, no que se diz respeito a mecanismos que podem minimizar essas situações adversas, a nutrição por meio dos macronutrientes (proteína, lipídeos e carboidratos), micronutrientes (vitaminas e minerais) e aditivos funcionais podem desempenhar, direta ou indiretamente, papel essencial na defesa do organismo frente aos desafios impostos pelo sistema produtivo.

6. Perfil hematológico em peixes

Sabe-se que a composição sanguínea dos peixes é de eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os eritrócitos são nucleados, citoplasma apresenta coloração vermelho claro e homogêneo (THRALL et al., 2007). Na escala evolutiva, o tamanho e o número dos

eritrócitos foram influenciados, sendo os eritrócitos maiores e em menor número em espécies mais ativas, como os teleósteos (LAY e BALDWIN, 1999). Segundo Rambhaskar e Srinivasa-Rao (1987), os teleósteos possuem maior aporte metabólico, devido à necessidade considerável de oxigênio para suprir o seu metabolismo.

Os leucócitos são células responsáveis pela defesa do organismo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Apresentam diferentes linhagens celulares nas quais são diferenciados morfológicamente pela presença ou ausência de granulações, assim como por suas características morfológicas, coloração e função (SATAKE et al., 2009). São eles: monócitos (possui habilidade de migração dos vasos sanguíneos até o foco da infecção), neutrófilos (responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas), eosinófilos (evidências de sua participação em processos de defesa contra parasitas) e basófilos (evidências de sua participação em processos de fagocitose) usualmente observados na circulação dos peixes.

De acordo com Tavares-Dias et al. (2002), os trombócitos dos peixes são células elípticas com núcleo fusiforme e com intensa vacuolização. São responsáveis pela coagulação sanguínea e defesa do organismo por meio da atividade fagocítica, podendo ser hemostática e homeostática.

A hematologia em peixes é considerada importante ferramenta em piscicultura, pois permite verificar os efeitos gerados por deficiências nutricionais ou acometimento por bactérias (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Estudos demonstram que a utilização do perfil hematológico reflete nas respostas fisiológicas dos organismos de forma consistente, além de atuar na prevenção de patologias e estresse de manipulação (ALDRIN et al., 1982).

7. Referências

- ABATE, C.; PATEL, L.; RAUSCHER, F. J. III.; CURRAN, T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. **Science**, v. 249, p. 1157–1161, 1990.
- AHMAD, S. Oxidative stress from environmental pollutants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 135–157, 1995.
- ALDRIN, J. F.; MESSEGER, J. L.; LAURENCIN, F. B. La Biochimie Clinique en Aquaculture. In: **Intérêt et perspective. CNEXO Actes Colloq**, p. 291–326, 1982.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 1994.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 33, n. 2, p. 111–128, 2008.
- BARTON, B. A.; DWYER, W. P. Physiological stress effects of continuous-and pulsed-DC electroshock on juvenile bull trout. **Journal of Fish Biology**, v. 51, n. 5, p. 998–1008, 1997.
- BELTRÁN, J. M. G.; ESPINOSA, C.; GUARDIOLA, F. A.; ESTEBAN, M. Á. In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 79, 1–10, 2018.
- CARILLON, J.; BARBE, F.; BARIAL, S.; SABY, M.; SACY, A.; ROUANET, J. M. Diet supplementation with a specific melon concentrate improves oviduct antioxidant defenses and egg characteristics in laying hens. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1898–1904, 2016.
- CARILLON, J.; DEL RIO, D.; TEISSÈDRE, P. L.; CRISTOL, J. P.; LACAN, D.; ROUANET, J. M. Antioxidant capacity and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of a melon concentrate rich in superoxide dismutase. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1298–1302, 2012.
- CARILLON, J.; KNABE, L.; MONTALBAN, A.; STÉVANT, M.; KEOPHIPHATH, M.; LACAN, D.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J. M. Curative diet supplementation with a melon superoxide dismutase reduces adipose tissue in obese hamsters by improving insulin sensitivity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 4, p. 842–850, 2014.
- CARILLON, J.; ROMAIN, C.; BARDY, G.; FOURET, G.; FEILLET-COUDRAY, C.; GAILLET, S.; LACAN, D.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J-M. Cafeteria diet induces

obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 254–261, 2013.

CARILLON, J.; ROUANET, J. M.; CRISTOL, J. P. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 11, p. 2718–2728, 2013.

DA SILVA, B. C.; DO NASCIMENTO VIEIRA, F.; MOURIÑO, J. L. P.; FERREIRA, G. S.; SEIFFERT, W. Q. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384, p. 104–110, 2013.

DECORDE, K.; AGNE, A.; LACAN, D.; RAMOS, J.; FOURET, G.; VENTURA, E.; FEILLET-COUDRAY, C.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J. M. Preventive effect of a melon extract rich in superoxide scavenging activity on abdominal and liver fat and adipokine imbalance in high-fat-fed hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6461–6467, 2009.

EPPERLY, M. W.; LIGGITT, D.; GREENBERGER, J. S. Systemic intravenous (IV) as well as local administration of manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) displays no detectable toxicity while offering protection from irradiation-induced damage. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 63, p. S487–S488, 2005.

GALILI, O., VERSARI, D., SATTLER, K. J., OLSON, M. L., MANNHEIM, D., MCCONNELL, J. P., CHADE, A. R.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2007.

GOTTLIEB, M. G. V.; SCHWANKE, C. H. A.; BODANESE, L. C. DA CRUZ, I. B. M. Status Antioxidante, Diabetes Mellitus II e Aterosclerose. **Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 1, p. 99–106, 2009.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl 1, p. S110–S118, 2004.

GUARDIOLA, F. A.; BAHÍ, A.; JIMÉNEZ-MONREAL, A. M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; MURCIA, M. A.; ESTEBAN, M. A. Dietary administration effects of fenugreek seeds on skin mucosal antioxidant and immunity status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 75, 357–364, 2018.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Indicadores IBGE**: Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf. Acesso em: 17 mar. 2019.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 755–766, 1995.

LAY, P. A.; BALDWIN, J. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 31–35, 1999.

LESTER, G. Melon (*Cucumis melo* L.) fruit nutritional quality and health functionality. **Hortscience**, v. 31, 693–c693, 1996.

LIU, J.; YEO, H. C.; DONIGER, S. J.; AMES, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography–mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 161–166, 1997.

MAHMOUD, H. K.; AL-SAGHEER, A. A.; REDA, F. M.; MAHGOUB, S. A.; AYYAT, M. S. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 475, 16–23, 2017.

MAHMOUDI, R.; FAKHRI, O.; FARHOODI, A.; KABOUDARI, A.; PIR-MAHALLEH, S. F. R.; TAHAPOUR, K.; KHAYYATI, M.; CHEGINI, R. A review on probiotic dairy products as functional foods reported from Iran. **Journal of Food and Nutrition**, v. 6, 3–8, 2015.

MAIESE, K.; DANIELA MORHAN, S.; ZHONG CHONG, Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Current Neurovascular Research**, v. 4, n. 1, p. 63–71, 2007.

MALHOTRA, O. P.; RANI, I. Occurrence, isolation & characterisation of urease-inhibitor from melon (*Cucumis melo*) seeds. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 15, n. 3, p. 229–231, 1978.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 933S–940S, 2003.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 2000.

MILIND, P.; KULWANT, S. Musk melon is eat-must melon. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 8, p. 52–57, 2011.

MILIND, P.; KULWANT, S. Musk melon is eat-must melon. **International Researcher Journal of Pharmacy**, v. 2, 52–57, 2011.

MOON, J.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1322S–1326S, 1995.

NORDMANN, R.; RIBIÈRE, C. Superoxyde dismutases: rôle biologique: espoir thérapeutique. **Cahiers de Nutrition et de Diététique**, v. 26, n. 6, p. 398-402, 1991.

NOTIN, C.; VALLON, L.; DESBORDES, F.; LELEU, C. Oral supplementation with superoxide dismutase in Standardbred trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, p. 375–381, 2010.

OLIVARES-CORICHI, I. M.; MEDINA-NAVARRO, R.; TORRES-RAMOS, Y. D.; MONTES-CORTÉS, D. H. Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 14, n. 4, p. 237–240, 2006.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

RAMBHASKAR, B.; SRINIVASA RAO, K. Comparative haematology of ten species of marine fish from Visakhapatnam Coast. **Journal of Fish Biology**, v. 30, n. 1, p. 59–66, 1987.

RANZANI-PAIVA, M. T. J. e SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de Peixes Brasileiros In: Sanidade de Organismos Aquáticos. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

ROSEN, G. D. Feed additive nomenclature. **World's Poultry Science Journal**, v. 52, n. 1, p. 53–57, 1996.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. D.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Macapá: Embrapa Macapá, p. 330–345, 2009.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S–1321S, 1995.

SILVA, B. V.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, 144–158, 2016.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, p. 693–698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004.

THANIGAIVEL, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A.; THOMAS, J. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. **Aquaculture**, 464, 529–536, 2016.

THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Editora Roca, 2007.

TRABER, M. G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 23, n. 3-6, p. 135–139, 1997.

VICENTE, I. S.; FLEURI, L. F.; CARVALHO, P. L.; GUIMARÃES, M. G.; NALIATO, R. F.; MÜLLER, H. D. C.; SARTORI, M. M. P.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. **Aquaculture Research**, v. 50, 80–92, 2019.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813–839, 2007.

VOULDOUKIS, I.; LACAN, D.; KAMATE, C.; COSTE, P.; CALENDIA, A.; MAZIER, D.; CONTI, M.; DUGAS, B. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 67–75, 2004.

YILMAZ, S. Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, 1125–1133, 2019.

ZAHRAN, E.; EL-GAWAD, E. A. A.; RISHA, E. Dietary *Withania somnifera* root confers protective and immunotherapeutic effects against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 80, 641–650, 2018.

ZEB, A. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Melon (*Cucumis melo* L.) Seeds from Pakistan. **Foods**, v. 5, 67, 2016.

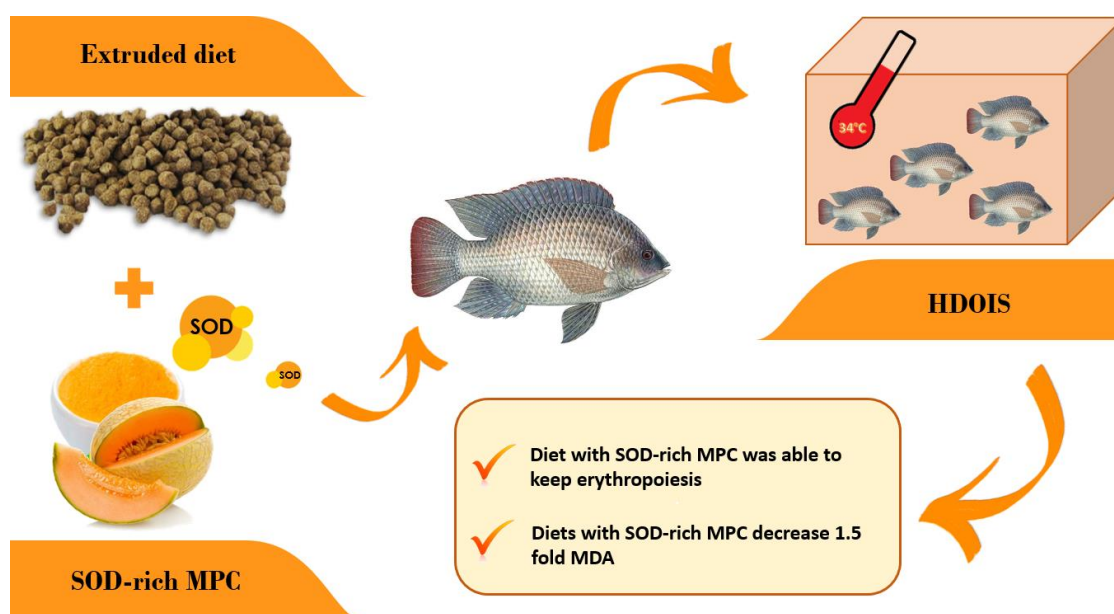
ŽITŇANOVÁ, I.; SUMEGOVÁ, K.; ŠIMKO, M.; MARUNIAKOVÁ, A.; CHOVANOVÁ, Z.; CHAVKO, M.; ĎURAČKOVÁ, Z. Protein carbonyls as a biomarker of foetal-neonatal hypoxic stress. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 567–570, 2007.

Capítulo II

The putative effect of a SOD-rich melon pulp concentrate on growth performance and antioxidant status of Nile tilapia under heat/dissolved oxygen-induced stress

Abbreviations: SOD-rich MPC, superoxide dismutase rich melon pulp concentrate; HDOIS, heat/dissolved oxygen-induced stress

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

This study evaluated the effects of SOD-rich melon pulp concentrate (SOD-rich MPC) on growth performance, hematological profile and antioxidant enzyme activity of Nile tilapia subjected heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS). A group of 462 male Nile tilapia ($8.87 \text{ g} \pm 0.12$) was randomly distributed in 42 250-L aquaria (11 fish/tank) and fed seven practical diets with graded levels of SOD-rich MPC at 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 1.0% for 60 days. The diets were formulated to contain 30% crude protein and 18 MJ kg^{-1} crude energy. After the feeding period, growth performance was evaluated and

six fish per treatment were sampled for hematological profile and antioxidant enzyme activity. Then, fish were subjected to HDOIS (34°C/1.87 mg/L⁻¹ dissolved oxygen) for two days and the same hematological profile and antioxidant enzyme activity were determined. In the present study, SOD-rich MPC was able to keep erythropoiesis and antioxidant capacity under HDOIS, but did not affect growth performance. The concentration of MDA in fish fed diets supplemented with SOD-rich MPC decreased by 1.5 fold after HDOIS. The results of the present study suggest that 0.5% SOD-rich MPC dietary supplementation was appropriate to maintain Nile tilapia health and improve their antioxidant capacity under HDOIS.

Keywords: additive, hematological profile, oxidative stress, *Oreochromis niloticus*, stress in fish.

Highlights:

1. SOD activity was higher in fish exposed to HDOIS.
2. Dietary-rich MPC was able to keep erythropoiesis under HDOIS.
3. Diets containing SOD-rich MPC decrease 1.5 fold MDA under HDOIS.

1. Introduction

Intensive fish culture has shown many advantages over extensive rearing, although attention has to be paid in order to prevent the adverse effects on fish health caused, mainly, by different stressors (Wedemeyer, 1996). According to Tort (2011), stress is an event that most animals experience which induces responses involving different regulatory systems. The immune system is one of them and depending on the stressor, the

immune response can be increased or suppressed. Additionally, stress response may lead to an oxidative stress condition.

Oxidative stress is defined as an excessive production of reactive oxygen species (ROS) that cannot be countered by the action of antioxidants (Seis, 1985). In intensive fish culture, many stressors may impair fish homeostasis. High temperature and hypoxia are environmental-related types of stress, when ROS generation can increase drastically under both conditions (Cadenas, 1989), different from normal physiological states, when ROS production is equal to the antioxidant response. Enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidases play an important role in the antioxidant response (Lesser, 2006).

Studies have shown that dietary antioxidant supplementation could be a potential nutritional strategy. Thus, different compounds, extracts and by-products have been tested. Yilmaz (2019) has demonstrated the antioxidant capacity of blackberry syrup for Nile tilapia; Vicente et al. (2019) demonstrated the antioxidant capacity of orange peel fragment for Nile tilapia under heat/dissolved oxygen stress; Guardiola et al. (2018) showed the antioxidant capacity of fenugreek seeds for gilthead seabream; Beltran et al. (2018) showed, *in vitro*, the antioxidant capacity of *Origanum vulgare* leaf extracts; Zahran et al. (2018) showed the antioxidant capacity of *Whitania somnifera* roots for Nile tilapia under *Aeromonas hydrophila* challenge and Mahmoud et al. (2017) showed curcumin antioxidant capacity for Nile tilapia.

A SOD-rich melon pulp concentrate (MPC) has been also evaluated in animal nutrition, aiming to improve the antioxidant capacity. According to The Brazilian Institute of Geography (IBGE, 2016) the melon (*Cucumis melo* L.) production in Brazil reached 596430 million tons, contributing with 1.8% of world production (FAO, 2016). China is the biggest melon producer and Brazil is the ninth (FAO, 2016). The melon pulp

concentrate is obtained after crushing the melon, recovering the pulp, centrifuging, filtrating and freeze-drying. A SOD-rich MPC was tested with hamsters, and showed a new alternative to reduce obesity induced by a high-fat diet (Decordé et al., 2009), and a beneficial effects on atherosclerosis and liver steatosis (Decordé et al., 2010). Notin et al. (2010) suggested that a SOD-rich MPC might increase horse blood resistance to haemolysis and reduce the muscular membrane permeability increment induced by training. Lallés et al. (2011) showed that a SOD-rich MPC was effective in lowering the level of stress proteins along the gastrointestinal tract of post-weaning piglets. Carillon et al. (2016) demonstrated that MPC increased the endogenous antioxidant defenses in the oviduct, thus determining better egg characteristics, and Ahasan et al. (2018) has showed that a SOD-rich MPC improves the total antioxidant capacity and the half-hemolysis time in red blood cells of post-weaning piglets, with positive results on growing performance.

Although a SOD-rich MPC has been studied with mammals and poultry, to our knowledge, there is no report on its effect on antioxidant capacity for fish. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity of a SOD-rich MPC for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under heat/dissolved oxygen-induced stress.

2. Material and methods

This study comprised two phases. In phase I, fish were fed experimental diets containing levels of a SOD-rich MPC, in order to nutritionally prepare them to cope with stress. In phase II, fish were subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS) in order to better understand the putative nutritional effect of melon pulp concentrate on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) health.

2.1. Experimental diets

The trial tested graded levels of dietary supplementation SOD-rich melon pulp concentrate (MPC), a dried melon juice concentrate rich in SOD (min. 65.000 IU/kg; Lallemand SAS, Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France). Seven practical diets containing graded levels of SOD-rich MPC (0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 and 1.0% MPC) were formulated containing 30% crude protein and 18 MJ kg⁻¹ crude energy (NRC, 2011). Dietary ingredients were ground, homogenized in a mixer (Ação Científica[®], Piracicaba, SP, Brazil), moisturized, extruded (Esteec[®], Ribeirão Preto, SP, Brazil) and dried in a forced air oven (55°C; 24h). After, the diets were then coated with a SOD-rich MPC mixed in oil and added using an industrial blender for 10 minutes. The chemical composition of both, SOD-rich MPC and the experimental diets were analyzed according to AOAC protocols (2000).

2.2. Feeding trial (Phase I)

A group of 462 male Nile tilapia fingerlings was obtained from a commercial fish farm (Palmital, SP, Brazil), and transferred to AquaNutri Laboratory facilities (FMVZ, Botucatu, SP, Brazil). Then, fish were kept in wet laboratory conditions and fed on basal diet with no SOD-rich MPC supplementation for four weeks before starting the feeding trial.

Fish were then randomly sampled 8.87 ± 0.12 g (mean \pm SD), stocked in aquaria (250 L, 11 fish/aquarium) and fed for 60 days to apparent satiation in four daily meals (8h00m, 11h00m, 13h00m and 17h00m) with experimental diets, in a totally randomized design trial (n=6).

After the feeding period, the growth performance of fish was calculated as follows:

Initial body weight (IBW) = initial mean weight (g/fish);

Final body weight (FBW) = final mean weight (g/fish);

Weight gain (WG) = final weight – initial weight;

Feed Intake (FI) = dry feed intake (g/fish);

Feed conversion rate (FCR) = feed intake / weight gain;

Specific growth rate (SGR) = $(\text{Ln of final weight} - \text{Ln of initial weight}) \times 100 /$
experimental period;

Survival rate (SUR) = $(\text{initial fish number} - \text{final fish number}) / \text{initial fish number}$
 $\times 100 (\%)$;

The recirculated system was maintained under a 12:12 h light:dark photoperiod schedule and water quality parameters recorded two times a week: temperature (26.8 ± 0.40 °C); pH (6.55 ± 0.28); and dissolved oxygen (6.60 ± 0.71 mg L⁻¹).

2.3. Heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS) (Phase II)

At the end of the 60-day, four fish per tank were randomly netted from the feeding system and transferred to the challenge system keeping tank origin and dietary allocation discrete. The experimental challenge room comprised 42 40 L-plastic aquaria individually fitted without aeration, mechanical and biological filtration, and submersed water-heater. Upon transfer, all experimental tanks were submitted to a consistent heat/dissolved oxygen-induced stress by the gradual increase of the water temperature

from 25 to 34°C during 12h thus decreasing the oxygen concentration from 6.60 ± 0.71 to 1.87 ± 0.45 mg L⁻¹ for two days. The fish were fed the same experimental diet as in feeding trial (Phase I). The temperature and dissolved oxygen concentration were monitored hourly using an YSI 556® multi-probe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA).

2.4. Hematological assay (Phase I and II)

After fish were randomly collected and anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹), blood was collected from the caudal vein using a tuberculin syringe rinsed with anticoagulant (3% EDTA, Vetec, Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brazil) for determination of red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Htc), leukocyte (Leuk), total plasma protein (TPP) and albumin (ALB). Blood sample from each fish was considered a replicate. Red blood cell (RBC) was determined by dilution and enumeration using hemocytometer. The hemoglobin was determined by the cyanmethaemoglobin colorimetric method using a commercial kit (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) according to Collier (1944). The hematocrit was determined by microhematocrit method, as described by Goldenfarb et al. (1971). The mean corpuscular volume [MCV = (Htc x 10) / erythrocytes] and the mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC = (Hb x 100) / Htc] were calculated according to Wintrobe (1934).

The leukocyte differentiation was performed in a blood extension stained with May-Grünwald-Giemsa-Wright according to Jain (1986). Differential counting was performed under a microscope at x 100 in immersion oil. Two hundred cells were counted to establish the percentage of each cellular component.

The total plasma protein (TPP) was measured using a manual Goldberg refractometer by breaking the microhematocrit capillary just above the leucocyte layer after the hematocrit reading. The albumin concentration (ALB) was determined by the bromocresol method using the commercial kit Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) for colorimetric determination. The albumin:globulin ratio (A/G) was determined using albumin and total plasma protein values (Globulin = TPP – ALB; A/G = ALB/Globulin). The concentration of glucose (GLU) was determined, using commercial reagent kits (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil), with absorbance readings performed in a spectrophotometer. Cortisol (CORT) measurements were conducted with a commercial radioimmunoassay test (Beckman Coulter, Brea, California, EUA) according to the manufacturer recommendations.

2.5. Antioxidant enzyme activity (Phase I and II)

Liver samples obtained before and after HDOIS were used for antioxidant enzyme analyzes. Fish were killed by a lethal dose of anesthetic (benzocaine, 1.0 g L⁻¹). Liver samples were collected, immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until enzyme activity determination. Then, one gram of liver samples was homogenized in 5 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 2800 G-force for 20 minutes at 4°C. Supernatant was used for enzyme activity and protein content analyzes. Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assayed according to Beuchamp and Fridovich (1971), which measures one unit of SOD required to inhibit 50% of nitroblue tetrazolium (NBT), the inhibition of NBT was measured spectrophotometrically (Abs) at 560 nm. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed according to Sinha (1972), in which dichromate in acetic acid is reduced to chromic

acetate in the presence of H₂O₂ when heated, forming perchromic acid as an unstable intermediate. The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 610 nm. Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed according to Flohé and Güzler (1984). Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was assayed as described by Smith et al. (1988), measuring the oxidation of NADPH at 340 nm.

For all antioxidant enzyme assays the total protein concentration was determined by Bradford (1976) method with Coomassie brilliant blue G-250, using bovine serum albumin as a standard. The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 320 nm. Results were expressed as U.mg pt⁻¹ of specific activity.

2.6. Superoxide radical scavenging activity, DPPH and FRAP in diets

Superoxide radical scavenging activity in diets with SOD-rich MPC and product was performed according to Zhishen et al. (1999) with slight modification. All solutions were prepared in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.8). The photo-induced reactions were performed using fluorescent lamps (2400 lumens). The SOD-rich MPC in the reaction mixture was 30 µg/mL. The total volume of the reaction mixture was 5 mL and the concentrations of the riboflavin, methionine and NBT were 3mL, 1mL and 1mL, respectively. The reaction mixture was illuminated at 25 °C for 10 min. The un-illuminated reaction mixture was used as a blank. The absorbance was measured at 560 nm. The percentage of the superoxide anion scavenging was calculated according to the following formula:

$$\text{Superoxide scavenging effect (\%)} = [1 - (A_s/A_c)] \times 100$$

Where: A_c is the absorbance of the control and A_s is the absorbance in presence of superoxide dismutase or standards (Gülçin et al., 2007).

The capacity to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals was determined as described by Brand-Williams et al. (1995) and modified by Rossetto et al. (2009). Fresh sample (1 mg) was weighed into light-protected centrifuge tubes were extracted with ethanol and mixed with a 40 μ M DPPH ethanolic solution. Trolox was used as the reference standard to convert the inhibitory capacity of each sample to antioxidant power in trolox equivalence. The ferric reducing power (FRAP) was determined according to Benzie and Strain (1996).

2.7. Determination of total phenols (TP) and total flavonoids (TF) in diets

The TP content was determined according to Singleton and Rossi (1965). Extracts were prepared with 50% acetone. Folin-Ciocalteu reagent and 20% sodium carbonate were added to the mixture. The results were calculated with a gallic acid calibration curve. The TF content was determined according to Popova et al. (2004).

2.8. Fillet lipid oxidation (Phase I and II)

Six fish per treatment, either before or after stress, were randomly collected and anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹) for lipid peroxidation determination according to Vyncke (1970). Ten grams of fish fillets were homogenized with 50 ml of trichloroacetic acid 7.5% in a Mixer Philips® for 1 min. Then, the mixture was filtered and 5 ml of the extract was transferred to a tube containing 5 ml thiobarbituric acid 0.02 M. The tubes

were heated in a boiling water bath for 30 min and cooled in running water for 10 min, for the measurement of the 2-thiobarbituric acid reactive substances at 532 nm. The values were expressed as mg malonaldehyde/kg⁻¹ (MDA).

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) to determine whether the inclusion levels of SOD-rich MPC significantly affected the observed responses; in addition, a follow-up trend analysis using orthogonal polynomial contrasts was performed to determine whether the significant effects were linear, quadratic and cubic. All analyses were conducted using the Minitab[®] 16.1.1.0 software. Differences among treatments were considered significant at ($P < .05$). Each value of the data was expressed as mean \pm *SD*. Statistical analysis was performed by the Student t-test to compare values obtained before with values obtained after.

2.10. Ethics statement

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University (protocol 0163/2017 – CEUA).

3. Results

3.1. Growth performance

Additional dietary SOD-rich MPC affected SUR ($P < .05$; r^2 : 0.25) showing positive quadratic trends after 60 days of feeding. In contrast, dietary SOD-rich MPC had no significant effect on FBW, WG, SGR, FI and FCR (Table 2).

3.2. Hematological parameters before and after HDOIS

Analyzing the data obtained before the HDOIS, the orthogonal contrasts showed a quadratic ($P < .05$; r^2 : 0.08; r^2 : 0.05) trend for RBC and Hb, respectively (Table 3). As also, before the HDOIS, the orthogonal contrasts showed a linear ($P < .05$; r^2 : 0.19) and quadratic ($P < .05$; r^2 : 0.22) trend for Htc (Table 3). However, the dietary SOD-rich MPC supplementation had no effect on MCV and MCHC before the HDOIS and for all on hematological parameters after the HDOIS ($P > .05$).

By the comparison between values obtained before and after, HDOIS showed a decrease ($P < .05$) on RBC for fish fed 0.0, 0.2, 0.4 and 1.0 SOD-rich MPC (Table 3). As to Htc there was a decrease for fish fed 0.4 and 1.0 SOD-rich MPC ($P < .05$; Table 3). There was an increase on MCV for fish fed 0.2 and 0.4 SOD-rich MPC ($P < .05$; Table 3). Fish fed 0.1, 0.4 and 0.5 SOD-rich MPC showed highest MCHC after HDOIS ($P < 0.05$; Table 3). Fish fed 0.5 SOD-rich MPC showed a decrease on A:G ($P < .05$; Table 4). As to GLU there was a decrease for fish fed all diets, but did not for 0 and 0.2 SOD-rich MPC ($P < .05$; Table 4). However, the dietary SOD-rich MPC supplementation had no effect on Hb and CORT when comparison before and after HDOIS ($P > .05$; Table 3 and 4).

3.3. Leukogram before and after HDOIS

Analyzing the data obtained before the HDOIS, the orthogonal contrasts showed a linear ($P < .05$; r^2 : 0.03) and cubic ($P < .05$; r^2 : 0.33) trend for Neutr (Table 5). As also, after the HDOIS, the orthogonal contrasts showed a linear ($P < .05$; r^2 : 0.32) trend for Lymp (Table 5). However, the dietary SOD-rich MPC supplementation had no effect on Lymp before and Neutr after HDOIS, as to Mon before and after HDOIS ($P > .05$).

By the comparison between values obtained before and after stress, HDOIS determined a decrease ($P < .05$) on Lymp for fish fed 0.2 SOD-rich MPC. Fish fed 0, 0.1, 0.3 and 1.0 SOD-rich MPC showed a decrease ($P < .05$) on Neutr. As to Mon there was a decrease ($P < .05$) for fish fed 0.1 and 0.3 SOD-rich MPC (Table 6).

3.4. Liver antioxidant enzymes activity before and after HDOIS

The dietary SOD-rich MPC supplementation had no effect on SOD, CAT, GR, GPx and MDA, neither before nor after HDOIS ($P > .05$). By the comparison of enzymes activities before and after stress, HDOIS determined an increase ($P < .05$) on SOD for fish fed 0, 0.2, 0.4 and 1.0 SOD-rich MPC. As to GR and there was an increase for fish fed all diets ($P < .05$; Table 6). There was an increase on MDA for fish fed all diets ($P < .05$; Table 6). However, the dietary SOD-rich MPC supplementation had no effect on CAT and GPx when comparison before and after HDOIS ($P > .05$; Table 6). Aiming to confirm the presence and activity of the SOD in the experimental diets and the product, it was determined the superoxide anion radical scavenging activity and SOD activity (Figures 1 and 2).

4. Discussion

This research considers, the antioxidant capacity of SOD-rich MPC for Nile tilapia under heat-dissolved oxygen stress. Although researches have shown that plants present health benefits, there is a concern related to natural enzymes activities, due to inactivation and digestion along the gastrointestinal transit, consequently destroying its antioxidant pharmacological properties (Giri and Misra, 1984). Among the sources of antioxidant enzymes, *Cucumis melo* L. extract has been studied due to the presence of SOD. Vouldoukis et al. (2004) showed that SOD activity could be preserved during the digestive process by its combination with wheat gliadin, forming a biodegradable gliadin biopolymer, thus eliciting the antioxidant and anti-inflammatory effects of this antioxidant enzyme. Another important characteristic of gliadin is the interaction with the CXCR3 receptors of epithelial cells stimulating the production of zonulin, a protein capable of interfering with intercellular junctions, increasing intestinal permeability to the passage of gliadin and other macromolecules (Lammers et al. 2008). The SOD-rich MPC, used in this study, is a product diluted in wheat middlings, which could have preserved its activity, as shown by the hematological and antioxidant results and the SOD activity performed in the product and diets. In addition, SOD-rich MPC antioxidant capacity was also demonstrated by DPPH, FRAP and superoxide anion radical scavenging activity.

In the present study, dietary SOD-rich MPC supplementation was capable of maintaining fish erythropoiesis and antioxidant capacity under HDOIS, but had not effect on growth performance. As to SUR, the orthogonal contrasts exhibited a weak correlation between SOD-rich MPC and survival (r^2 : 0.25). Although the main effect expected from SOD-rich MPC was related to its antioxidant characteristics, Ahasan et al. (2018)

described a positive effect on feed intake and daily growth rate for post-weaning piglets. An opposite result was observed in this study, since growth performance was not affected. This result could be explained by the possible lack of fish feeding stimulant, prebiotic characteristic, and even the growth-related gene expression of SOD-rich MPC, as it has been described for some fruits and herbs polyphenols (Wilson, 2015; Mallek-Ayadi et al., 2017; Silva et al., 2018). Therefore, further studies should address these issues, in order to understand the different results described for fish and piglets, which could increase the advantages of the use of this co-product.

Since our goal was to verify the improvement on antioxidant capacity by using SOD-rich MPC as a feed additive, Nile tilapia was challenged by HDOIS in order to cause oxidative stress. Such stress occurrence can be verified by the increase on malondialdehyde (MDA) concentration, which is considered a biomarker for oxidative stress (Valavanidis et al., 2006; Pandey and Risvi, 2011). Regarding the glucose levels, as a secondary stress indicator, it was expected an increase in the blood glucose after HDOIS, but the concentration was lower than before. HDOIS caused an increase in cortisol levels, but this result did not present statistical significance when comparing before and after stress data, which can be explained by the high standard deviation. However, elevation of cortisol levels affects glycogenesis and could have been inhibited (Pagnotta and Milligan, 1991; Ellis et al. 2012). These results were previously described for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after fish been submitted to 12h exhaustion exercise, which showed a decrease on glucose and increase on cortisol (Pagnotta and Milligan, 1991). Moreover, it can be linked to the depletion of energy reserve. Martínez-Porchas et al. (2009) described that sometimes no significant changes in plasma glucose can be observed, because under stress fish rapidly consume the energetic substrates

generated (glucose), since the main function of the central nervous system is to maintain homeostasis.

Regarding the hematological profile, it can be observed that, although there was significant differences among SOD-rich MPC levels mainly for RBC, Hb and Htc, either before or after HDOIS, the values remained within the normal range for healthy Nile tilapia, as described by Teixeira et al. (2012); Damasceno et al. (2016) and Vicente et al. (2019), in the same laboratory and under the same conditions, and also by Hrubec and Smith (2010).

The main effect expected from fish under HDOIS was the increase on Hb, which was not different statically. A decrease on RBC and Htc, and an increase on MCV and MCHC was determined, although within the normal range as mentioned above, and there was no correlation with SOD-rich MPC supplementation. The results could be attributed to HDOIS, but again did not show a trend. Some hypothesis may explain these results: the diet formulation was based on digestible nutrients and energy, which could have helped fish to attend its requirements and, consequently, to cope with this acute stress; also the length of this induced stress (48h) could not be sufficient to impair erythropoiesis. Moreover, vitamins E and C were supplemented in the diets. Vitamin E (75 mg/kg) reached the requirement for normal growth (50-100 mg/kg; NRC, 2011) and vitamin C (300 mg/kg diet), which may have acted as antioxidant protection for membrane and endogenous compounds (Kiron et al., 2004; Combs, 2012), probably avoiding significant cell fragility after HDOIS. In addition, RBC are equipped with effective anti-oxidative systems that make them mobile free radical scavengers, providing antioxidant protection, not only to themselves but also to other tissues and organs (Pandey and Rizvi, 2011).

In general, the innate immune system has both cellular and humoral components, through which it carries out its protective function; leukocytes are responsible for the

initiation of an adaptive immune response and the subsequent resolution of an inflammatory process. In this study, there was a decrease in the number of lymphocytes, neutrophils and monocytes for all treatments, which is expected in response to stress (Tort, 2011; Damasceno et al., 2016; Vicente et al., 2019). However, when comparing the number of Lymp, Neutr and Mon, of fish fed the control diet and fish fed the diets supplemented with SOD-rich MPC, it can be observed that SOD-rich MPC supplementation showed a smaller decrease up to 1.4, 2.4 and 1.1 fold, respectively, when compared with diet with no SOD-rich MPC supplementation. Some anti-inflammatory effects of melon extracts have been already described (Murcia et al., 2001; Campanella et al., 2003). These data agree with previous reports indicating that the anti-inflammatory properties of SOD were not only related due to its enzymatic antioxidant property but also to the concomitant stimulation of anti-inflammatory and immuno-regulatory molecules synthesis (Vouldoukis et al., 2000).

Besides the cells antioxidant protection and the antioxidants included in the diets, dietary SOD-rich MPC provided antioxidant protection for fish under HDOIS, since liver SOD activity was 10% higher for fish fed diets supplemented from 0.2 MPC than that of the control diet, and MDA concentration was lower for fish fed all SOD-rich MPC supplemented diets. The conditions that fish were exposed to, high temperature stress (34°C) and hypoxia ($1.87 \pm 0.45 \text{ mg L}^{-1}$), can generate numerous oxygen-derived radicals, as described by Stogner and Payne (1992) and Lushchak, (2011). Under these conditions, the endogenous antioxidant capacity could have been suppressed, leading to a high susceptibility to oxidative stress (Pisoschi and Pop, 2015). The role of SOD is to catalyze the dismutation of superoxide ion into oxygen and hydrogen peroxide, then be decomposed into water and oxygen by CAT and GPx (Halliwell and Gutteridge, 2007), thus avoiding oxidative stress consequences.

In this study, SOD activity after HDOIS significantly increased in all treatments, but 0.1, 0.3 and 0.5 SOD-rich MPC. By the comparison of fillet MDA concentration on fish fed the control diet and fish fed the diets supplemented with SOD-rich MPC it can be observed that SOD-rich MPC supplementation decreased 1.5 fold MDA fillet concentration, which is considered a major lipid peroxidation product (Pandey and Rizvi, 2011). Therefore, the oxidative stress occurred, although it was probably less harmful due to the dietary SOD-rich MPC supplementation. Similar results were described for Standardbred trotters by Notin et al. (2010) and by Lalles et al. (2011) for pigs; and an opposite result was showed by Ahasan et al. (2018) for post-weaning piglets related to SOD activity. However, it was described an increase on total antioxidant capacity.

In this study, CAT and GPx did not significantly increase, although an oxidative stress occurred. Two hypotheses may help to explain these results. First of all, the increment on MDA concentration can determine a significant suppression of Nrf-2 gene expression that regulates the antioxidant enzymes activity. These results were previously described by Ahmed-Farid et al. (2018) in rats under H₂O₂ induced stress. Secondly, fish are able to excrete H₂O₂ through their gills (Wilhelm-Filho et al., 1994), then decreasing the need for antioxidants. Vicente et al. (2019) showed an increase on SOD, CAT and GPx for Nile tilapia kept under HDOIS for 72h, but not for 48h. Further studies should analyze the SOD-rich MPC capacity on expression of the Nrf2 gene, and its putative anti-inflammatory property.

In this study, the increase of GR after HDOIS seems to be associated with high production of hydrogen peroxide formed from the oxidation of glutathione (GSH). The GR has a secondary action in the removal of the reactive species, aiming to prevent the glutathione cycle from being stopped, as to, glutathione recovery to its reduced form as a

substrate for GPx. Such response is possibly related to the induced stress, therefore could have fish used this way to remove the reactive species generated during this period.

The SOD activity in the experimental diets and in the product, determined by the superoxide anion radical scavenging activity and SOD activity, was responsive to SOD-rich MPC supplementation, and the product itself showed the highest activity. Considering the total antioxidant activity results for all supplemented diets in comparison with control diet, the SOD-rich MPC determined a 1.2 fold increase on ROS scavenging capacity, and the product itself a 1.6 fold increment. The capacity of the control diet to scavenge ROS could be attributed to the antioxidant compounds present in the diet, as discussed above. SOD activity was also responsive to SOD-rich MPC supplementation, and the product itself showed 100 UI SOD (NBT)/mg. These results can guarantee that the coating method used to incorporate SOD-rich MPC was effective, demonstrating that this product can be used for fish diets, not only for poultry and swine, whose diets not necessarily need to be processed.

This study evaluated the SOD-rich MPC antioxidant characteristics and its capacity in the improvement of Nile tilapia resistance under stress. To our knowledge, this is the first study evaluating the dietary SOD-rich MPC supplementation in fish. Our findings shows that SOD-rich MPC is a potential alternative to be used by fish feed industry as a nutritional strategy to reduce the oxidative stress effects. In conclusion, based on the hematological profile and some antioxidant enzyme activities, it has been shown that dietary SOD-rich MPC between 0.4 and 0.5% contributed to the maintenance of erythropoiesis and antioxidant capacity in Nile tilapia under heat induced/dissolved oxygen stress.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the São Paulo State Research Support – FAPESP (2017/13217-9) for the financial support. The authors would also like to thank for Lallemand Animal Nutrition the SOD-rich MPC donation and the financial support.

6. References

- A. Pagnotta, C. L. M., 1991. The role of blood glucose in the restoration of muscle glycogen during recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Exp. Biol.* 161, 489–508.
- Ahasan, A. S. M. L., Invernizzi, G., Farina, G., Pilotto, A., Barbé, F., Bontempo, V., Rossi, R., Bellagamba, F., Lecchi, C., Savoini, C., Agazzi, A., 2019. The effects of superoxide dismutase-rich melon pulp concentrate on inflammation, antioxidant status and growth performance of challenged post-weaning piglets. *Animal* 13, 136–143.
- Ahmed-Farid, O. A., Rizk, H. A., Shehata, A. M., 2018. Hydrogen peroxide modulates redox status, energy metabolism, and gene expression in a dose-and time-dependent manner in rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32, 22199.
- AOAC - Official Methods of Analysis. 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 17th ed.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287.

- Beltrán, J. M. G., Espinosa, C., Guardiola, F. A., Esteban, M. Á., 2018. In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol.* 79, 1–10.
- Benzie, I. F., Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Brazilian Institute of Geography (IBGE). 2016. Dispone em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=1&i=P&e=l&c=1612>.
Access in: 11 dec. 2018.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79–110.
- Campanella, L., Bonanni, A., Favero, G. Tomassetti, M., 2003. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 1011–1016.
- Carillon, J., Barbe, F., Barial, S., Saby, M., Sacy, A., Rouanet, J. M., 2016. Diet supplementation with a specific melon concentrate improves oviduct antioxidant defenses and egg characteristics in laying hens. *Poult. Sci.* 95, 1898–1904.
- Collier, H. B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550–552.
- Combs, G. F. 2012. *The vitamins*. London: Elsevier/Academic Press.
- Conti, M., Calenda, A., Coste, P., Lacan, D., Dugas, B., Kamate, C., Mazier, D., Vouldoukis, I., 2004. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis*

- melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. *J. Ethnopharmacol.* 94, 67–75.
- Damasceno, F. M., Fleuri, L. F., Sartori, M. M. P., Amorim, R. L., Pezzato, L. E., Silva, R. L., Carvalho, P. L. P. F., Barros, M. M., 2016. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. *Aquaculture* 454, 257–264.
- Decordé, K., A. Agne, D. Lacan, J. Ramos, G. Fouret, E. Ventura, C. Feuillet-Coudray, J. P. Cristol, J. M. R., 2009. Preventive effect of a melon extract rich in superoxide scavenging activity on abdominal and liver fat and adipokine imbalance in high-fat-fed hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6461–6467.
- Decordé, K., E. Ventura, D., Lacan, J., Ramos, J. P., Cristol, J. M. R., 2010. An SOD rich melon extract Extramel[®] prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 301–307.
- Dugas, B., 2002. Glisodin[®]: a nutraceutical product that promote the oral delivery of superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 33, S64.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C. I., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 163–188.
- Falcon, D. R., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Sampaio, F. G., Hisano, H., 2007. Physiological responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C and lipid-supplemented diets and submitted to low temperature stress. *J. World Aquac. Soc.* 38, 287–295.
- Flohè, L., Günzler, W. A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–120.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2016. Available in: <<http://faostat.fao.org/>>
Access in: 11 dec. 2018.

- Germano, C., 2001. SOD Gliadin: The Ultimate Defense Against Disease and Aging. Twin Streams, Pub. by Kensingt. 121–135.
- Giri, S. N., Misra, H. P., 1984. Fate of superoxide dismutase in mice following oral route of administration. *Med. Biol.* 62, 285–289.
- Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 56, 35–39.
- Guardiola, F. A., Bahi, A., Jiménez-Monreal, A. M., Martínez-Tomé, M., Murcia, M. A., Esteban, M.A., 2018. Dietary administration effects of fenugreek seeds on skin mucosal antioxidant and immunity status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 75, 357–364.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* 21, 354–361.
- H. Bruce Collier, 1944. Standardization of Blood Hæmoglobin Determinations. *Can Med Assoc J* 50 (6), 550–552.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine* (4th ed.). Oxford: Oxford University Press 888p.
- Hrubec, T. C., Smith, S. A., 2010 *Hematology of Fishes. Schalm's Veterinary Hematology.* Blackwell Publishing, p. 994-1003.
- Jain, N. C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th ed. Philadelphia, PA: Lea e Febiger.

- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka K., S. S., W.T., 2004. Antioxidant status and nonspecific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* 234, 361–379.
- Lallès J. P., Lacan D., David J. C., 2011. A melon pulp concentrate rich in superoxide dismutase reduces stress proteins along the gastrointestinal tract of pigs. *Nutrition* 27, 358–363.
- Lesser, M. P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Mahmoud, H. K., Al-Sagheer, A. A., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., Ayyat, M. S., 2017. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 475, 16–23.
- Mallek-Ayadi, S., Bahloul, N., Kechaou, N., 2017. Characterization, phenolic compounds and functional properties of *Cucumis melo* L. *Food Chem.* 221, 1691–1697.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L. R., Ramos-Enriquez, R., 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. *Panam. J. Aquat. Sci.* 4, 158–178.
- Murcia, M. A., Jimenez, A. M., Martínez-Tome, M., 2001. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *J. Food Prot.* 64, 2037–2046.
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fishes and shrimp. 2011.
- Notin, C., Vallon, L., Desbordes, F., Leleu, C., 2010. Oral supplementation with superoxide dismutase in Standardbred trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. *Equine Vet. J.* 42, 375–381.

- Pandey, K. B., Rizvi, S. I., 2011. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc 155.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur. J. Med. Chem. 97, 55–74.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B. S., A. G., Marcazzan, G. L., Bogdanov, S., 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochem. Anal. An Int. J. Plant Chem. Biochem. Tech. 15, 235–240.
- Rossetto, M. R. M., Vianello, F., Rocha, S. D., Lima, G. P. P., 2009. Antioxidant substances and pesticide in parts of beet organic and conventional manure. African J. Plant Sci. 3, 245–253.
- Sies, H.E.L.M.U.T., 1985. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. Oxidative Stress 1, 73–90.
- Silva, M. A., Albuquerque, T. G., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P., Costa, H. S., 2018. Melon (*Cucumis melo* L.) by-products: potential food ingredients for novel functional foods?. Trends Food Sci. Technol.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144–158.
- Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. Anal. Biochem. 47, 389–394.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). Analytical Biochemistry, 175(2), 408–413.
- Stogner S. W. P. D., 1992. Oxygen toxicity. Ann. Pharmacother. 26, 1554–1562.
- Tamiz, A., Thomas, K., Lu, R., Alkan, S., Lammers, K.M., Shea-Donohue, T., Fasano, A., Vogel, S.N., Brownley, J., Gerard, C., Lu, B., Rallabhandi, P., Antalis, T.,

- Netzel–Arnett, S., 2008. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135, 194–204.
- Teixeira, C. P., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Fernandes Júnior, A. C., Koch, J. F., Padovani, C. R., 2012. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. *Aquac. Res.* 43, 1081–1088.
- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1366–1375.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., and Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.
- Vicente, I. S., Fleuri, L. F., Carvalho, P. L., Guimarães, M. G., Naliato, R. F., Müller, H. D. C., Sartori, M. M. P., Pezzato, L. E., Barros, M. M., 2019. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquac. Res.* 50, 80–92.
- Vouldoukis, I., Lacan, D., Kamate, C., Coste, P., Calenda, A., Mazier, D., Conti, M. Dugas, B., 2004. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a *Cucumis melo* LC. *J. Ethnopharmacol.* 94, 67–75.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 12, 1084–1087.
- Wedemeyer, G., 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Springer Sci. Bus. Media.

- Wilhelm-Filho, D., Gonzalez-Flecha, B., Boveris, A., 1994. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27, 2879–2882.
- Wilson, W. N., Baumgarner, B. L., Watanabe, W. O., Alam, M. S., Kinsey, S.T., 2015. Effects of resveratrol on growth and skeletal muscle physiology of juvenile southern flounder. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 183, 27–35.
- Yilmaz, S., 2019. Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish Shellfish Immunol.* 84, 1125–1133.
- Zahran, E., El-Gawad, E. A. A., Risha, E. 2018. Dietary *Withania somnifera* root confers protective and immunotherapeutic effects against *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 80, 641–650.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.

Table 1
Formulation and centesimal composition of the experimental diets.

	0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC
Soybean meal (g.kg ⁻¹)	582	582	582	582	582	582.2	578.4
Corn (g.kg ⁻¹)	351.4	350.4	349.94	348.4	347.4	346.2	345
Soybean oil (g.kg ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30
DL-Methionine (98%) (g.kg ⁻¹)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
L-Threonine (98.5%) (g.kg ⁻¹)	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
L-Tryptophan (98%) (g.kg ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Dicalcium phosphate (g.kg ⁻¹)	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1
Vitamin C ¹ (g.kg ⁻¹)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Premix Vit/Min ² (g.kg ⁻¹)	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3
BHT ³ (g.kg ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Salt (g.kg ⁻¹)	1	1	1	1	1	1	1
SOD-rich MPC⁴ (g.kg⁻¹)	0	1	2	3	4	5	10
Chemical analysis							
Dry matter (%)	92.83	92.99	92.86	92.69	93.65	92.8	93.2
Crude protein (%)	30.59	30.61	30.58	30.14	29.78	29.9	29.85
Total lipids (%)	5.10	4.06	4.48	4.93	4.46	4.08	4.06
Crude energy (MJ.kg ⁻¹)	18.39	18.40	18.41	18.32	18.50	18.32	18.38
Crude fiber (%)	1.38	1.48	1.10	1.22	1.31	1.29	1.56
Ash (%)	5.54	5.54	5.58	5.60	5.61	5.55	5.55
Interfering compounds							
Total phenols (mg g ⁻¹)	137.8	131.8	133	129.6	122.2	135.7	139.7
DPPH ⁵ (ug/g Trolox <i>dw</i>)	13.33	13.10	14.51	13.46	13.23	13.29	14.57
FRAP ⁶ (mmol Fe/g)	317.4	350.3	363.6	368.1	397.2	399.2	405.0

¹Vitamin C – Rovimix® Stay – C[®] 35 – DSM. Nutritional Products, Switzerland.

²Vitamin and Mineral Premix (kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg.

³Butylated hydroxytoluene – antioxidant.

⁴ SOD-rich MPC (Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France) – Chemical composition: Dry matter: (96.06%), Crude Protein (7.53%), Crude Energy (16.76 MJ.kg⁻¹), Crude Fiber (8.20%), Crude Fat (3.34%).

⁵ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay.

⁶FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Table 2

Initial body weight (IBW), final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), survival (SUR) of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days.

	Diets							ANOVA (Pr > F)	Linear	Quadratic	Cubic
	0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC		Trend (Pr > F)	Trend (Pr > F)	Trend (Pr > F)
IBW (g)	8.8 ± 0.15	8.7 ± 0.06	8.9 ± 0.10	8.9 ± 0.09	8.9 ± 0.11	8.8 ± 0.13	8.8 ± 0.11	0.241	-	-	-
FBW (g)	80.5 ± 8.8	80.2 ± 10.0	78.2 ± 1.5	82.0 ± 10.3	75.2 ± 10.2	76.4 ± 11.9	74.7 ± 2.3	0.789	0.463	0.618	0.463
WG (g)	70.42 ± 8.8	71.3 ± 9.90	69.9 ± 0.58	72.73 ± 9.99	65.88 ± 10.29	66.99 ± 12.32	65.89 ± 2.37	0.815	0.528	0.462	0.542
SGR (%)	3.66 ± 0.18	3.67 ± 0.21	3.61 ± 0.05	3.68 ± 0.21	3.54 ± 0.22	3.57 ± 0.27	3.55 ± 0.06	0.805	0.386	0.573	0.596
FI (g)	93.76 ± 9.52	91.49 ± 10.33	90.61 ± 5.72	93.30 ± 10.34	89.97 ± 7.17	90.59 ± 11.03	84.04 ± 2.80	0.729	0.616	0.915	0.520
FCR	1.34 ± 0.13	1.29 ± 0.05	1.40 ± 0.17	1.29 ± 0.09	1.38 ± 0.14	1.36 ± 0.11	1.43 ± 0.001	0.432	0.563	0.702	0.833
SUR (%)	89.39 ± 10.63	100	100	100	95.45 ± 5.0	93.94 ± 4.7	100	0.008	0.085	0.001 ^a	0.405

Values are means ± SD of six replicates. No significant difference at P > 0.05 (Tukey Test).

0.0 SOD-rich MPC: control 0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet; 0.1 SOD-rich MPC: 0.1% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.2 SOD-rich MPC: 0.2% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.3 SOD-rich MPC: 0.3% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.4 SOD-rich MPC: 0.4% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.5 SOD-rich MPC: 0.5% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet and 1.0 SOD-rich MPC: 1.0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet.

^ay = -0.469x² + 4.2938x + 89.174 R² = 0.2526

Table 3

Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.

	HDOIS	Diets							ANOVA (Pr > F)	Linear Trend (Pr > F)	Quadratic Trend (Pr > F)	Cubic Trend (Pr > F)
		0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC				
RBC (10 ⁶ µL ⁻¹)	Before	2.81 ± 0.32 A	2.24 ± 0.24	2.76 ± 0.20 A	2.40 ± 0.28	2.82 ± 0.35 A	2.39 ± 0.44	2.76 ± 0.34 A	0.009	0.655	0.029 ^a	0.453
	After	2.23 ± 0.18 B	2.02 ± 0.20	2.39 ± 0.26 B	2.06 ± 0.26	2.14 ± 0.18 B	2.22 ± 0.14	2.13 ± 0.24 B	0.078	0.606	0.693	0.545
	P value	0.006	0.127	0.022	0.057	0.004	0.410	0.028				
Hb (g dL ⁻¹)	Before	8.57 ± 0.78	7.72 ± 0.88	8.08 ± 0.74	7.91 ± 0.50	9.25 ± 0.70	8.26 ± 0.75	8.30 ± 1.18	0.045	0.140	0.003 ^b	0.767
	After	8.23 ± 0.23	8.19 ± 1.54	8.37 ± 0.29	7.74 ± 0.93	8.54 ± 0.31	8.78 ± 0.62	8.20 ± 0.53	0.444	0.880	0.489	0.250
	P value	0.348	0.537	0.412	0.713	0.065	0.222	0.885				
Htc (%)	Before	36.75 ± 3.19	33.58 ± 2.54	35.18 ± 2.80	36.58 ± 1.74	38.58 ± 1.69 A	35.08 ± 2.73	38.0 ± 1.63 A	0.021	0.042 ^d	0.011 ^c	0.196
	After	32.58 ± 1.86	31.33 ± 2.99	36.67 ± 5.47	32.92 ± 3.48	33.83 ± 1.81 B	36.50 ± 2.43	34.38 ± 2.29 B	0.053	0.327	0.336	0.644
	P value	0.024	0.194	0.571	0.055	0.001	0.367	0.049				
MCV (fL)	Before	131.67 ± 13.15	151.19 ± 14.78	127.55 ± 8.90 B	145.47 ± 6.16	138.01 ± 12.91 B	149.61 ± 20.35	138.9 ± 15.95	0.047	0.446	0.390	0.971
	After	146.99 ± 14.17	155.92 ± 15.43	154.01 ± 22.37 A	161.81 ± 24.29	159.05 ± 14.50 A	164.61 ± 11.28	162.53 ± 13.70	0.642	0.189	0.609	0.991
	P value	0.084	0.601	0.036	0.173	0.026	0.158	0.074				
MCHC (g dL ⁻¹)	Before	23.38 ± 1.70	22.97 ± 1.67 B	23.0 ± 1.27	21.65 ± 1.76	23.94 ± 0.85 B	23.53 ± 0.75 B	21.78 ± 2.42	0.134	0.922	0.093	0.111
	After	24.61 ± 1.28	26.0 ± 2.73 A	23.2 ± 3.16	23.52 ± 1.30	25.27 ± 1.12 A	24.62 ± 0.60 A	23.84 ± 0.36	0.162	0.636	0.188	0.026
	P value	0.189	0.049	0.886	0.066	0.045	0.028	0.190				

RBC: red blood cell count; Hb: hemoglobin; Htc: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration. Means and *SD* – maximum of six replicates.Uppercase letters compare fish in the same treatment before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by T test ($P < 0.05$).Lowercase letters compare fish between treatments before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by Tukey test ($P < 0.05$).0.0 SOD-rich MPC: control 0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet; 0.1 SOD-rich MPC: 0.1% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.2 SOD-rich MPC: 0.2% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.3 SOD-rich MPC: 0.3% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.4 SOD-rich MPC: 0.4% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.5 SOD-rich MPC: 0.5% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet and 1.0 SOD-rich MPC: 1.0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet.

^ay = 0.018x² - 0.1363x + 2.7829 R² = 0.0804

^by = 0.0114x² - 0.04x + 8.2214 R² = 0.0544

^cy = 0.3571x + 34.843 R² = 0.1935

^dy = 0.0738x² - 0.2333x + 35.729 R² = 0.2183

Table 4

Plasmatic albumin:globulin ratio (A:G), glucose (GLU) and cortisol (CORT) of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.

	HDOIS	Diets							ANOVA (Pr > F)	Linear Trend (Pr > F)	Quadratic Trend (Pr > F)	Cubic Trend (Pr > F)
		0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC				
A:G (mg dL ⁻¹)	Before	0.39 ± 0.08	0.43 ± 0.15	0.37 ± 0.10	0.44 ± 0.05	0.41 ± 0.15	0.41 ± 0.05 A	0.45 ± 0.18	0.896	0.743	0.945	0.980
	After	0.32 ± 0.06	0.37 ± 0.08	0.37 ± 0.07	0.37 ± 0.12	0.34 ± 0.08	0.29 ± 0.04 B	0.32 ± 0.10	0.490	0.691	0.208	0.812
	P value	0.110	0.378	0.965	0.181	0.321	0.002	0.264				
GLU (mg dL ⁻¹)	Before	54.51 ± 8.63	59.93 ± 9.45 A	50.94 ± 10.79	54.52 ± 7.67 A	58.33 ± 4.79 A	53.23 ± 8.21 A	62.57 ± 5.61 A	0.290	0.835	0.463	0.178
	After	53.54 ± 20.98	38.62 ± 4.67 B	46.64 ± 17.05	39.30 ± 2.00 B	39.65 ± 10.29 B	41.98 ± 6.17 B	43.89 ± 2.81 B	0.343	0.090	0.413	0.346
	P value	0.920	0.002	0.616	0.005	0.005	0.025	0.004				
CORT (ng/mL)	Before	40.01 ± 14.44	20.29 ± 14.54	41.0 ± 25.21	39.1 ± 30.6	46.0 ± 45.6	34.55 ± 12.51	44.2 ± 25.7	0.892	0.446	0.538	0.450
	After	67.9 ± 72.77	67.3 ± 47.7	66.4 ± 50.3	57.8 ± 45.4	79.8 ± 53.8	57.2 ± 51.1	83.9 ± 90.1	0.992	0.865	0.704	0.701
	P value	0.400	0.064	0.361	0.462	0.349	0.345	0.539				

Means and *SD* – maximum of six replicates.

Uppercase letters compare fish in the same treatment before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by T test ($P < 0.05$).

Lowercase letters compare fish between treatments before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by Tukey test ($P < 0.05$).

0.0 SOD-rich MPC: control 0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet; 0.1 SOD-rich MPC: 0.1% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.2 SOD-rich MPC: 0.2% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.3 SOD-rich MPC: 0.3% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.4 SOD-rich MPC: 0.4% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.5 SOD-rich MPC: 0.5% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet and 1.0 SOD-rich MPC: 1.0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet.

Table 5

Lymphocyte (Lymp), neutrophil (Neutr), and monocyte (Mon) counts of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.

	HDOIS	Diets							ANOVA (Pr > F)	Linear Trend (Pr > F)	Quadratic Trend (Pr > F)	Cubic Trend (Pr > F)
		0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC				
Lymp ($10^3 \mu^{-1}$)	Before	97.4 ± 33.4	69.88 ± 20.38	119.9 ± 30.8 A	99.1 ± 24.8	91.04 ± 20.78	98.50 ± 51.2	83.20 ± 41.9	0.296	0.701	0.533	0.139
	After	67.02 ± 12.6	50.37 ± 7.27	74.60 ± 28.9 B	77.92 ± 13.28	92.52 ± 12.51	78.55 ± 6.19	73.76 ± 4.73	0.002	0.000 ^a	0.073	0.129
	P value	0.097	0.104	0.008	0.182	0.837	0.336	0.662				
Neutr ($10^3 \mu^{-1}$)	Before	6.66 ± 2.62 A	3.00 ± 1.15 A	5.18 ± 1.43	4.70 ± 2.13 A	2.80 ± 0.89	5.09 ± 0.48	5.03 ± 0.63 A	0.001	0.004 ^b	0.703	0.001 ^c
	After	2.42 ± 0.50 B	1.93 ± 0.65 B	4.24 ± 1.80	2.49 ± 0.74 B	2.54 ± 1.69	10.97 ± 7.24	4.01 ± 0.56 B	0.000	0.845	0.500	0.813
	P value	0.008	0.025	0.342	0.028	0.760	0.140	0.014				
Mon ($10^3 \mu^{-1}$)	Before	3.77 ± 1.88	3.86 ± 0.95 A	4.50 ± 1.42	3.43 ± 0.58 A	3.41 ± 2.12	3.91 ± 2.42	5.62 ± 2.29	0.510	0.618	0.476	0.827
	After	2.24 ± 1.44	1.64 ± 0.48 B	3.81 ± 1.47	2.40 ± 1.06 B	3.10 ± 1.42	4.16 ± 1.59	1.79 ± 0.09	0.011	0.142	0.606	0.689
	P value	0.224	0.007	0.572	0.045	0.802	0.866	0.093				

Means and *SD* – maximum of six replicates.

Uppercase letters compare fish in the same treatment before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by T test ($P < 0.05$).

Lowercase letters compare fish between treatments before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by Tukey test ($P < 0.05$).

0.0 SOD-rich MPC: control 0% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet; 0.1 SOD-rich MPC: 0.1% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet, 0.2 SOD-rich MPC: 0.2% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet, 0.3 SOD-rich MPC: 0.3% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet, 0.4 SOD-rich MPC: 0.4% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet, 0.5 SOD-rich MPC: 0.5% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet and 1.0 SOD-rich MPC: 1.0% supplementation of melon pulp concentrate kg^{-1} diet.

$$^a y = 3.3757x + 60.029 \quad R^2 = 0.3239$$

$$^b y = -0.1114x + 5.0843 \quad R^2 = 0.0324$$

$$^c y = -0.0369x^3 + 0.63x^2 - 3.1195x + 8.6543 \quad R^2 = 0.3327$$

Table 6

Liver antioxidant enzymes activity and malondialdehyde production on fillet of Nile tilapia fed diets containing levels of SOD-rich MPC for 60 days and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.

	HDOIS	Diets							ANOVA (Pr > F)	Linear Trend (Pr > F)	Quadratic Trend (Pr > F)	Cubic Trend (Pr > F)
		0.0 SOD-rich MPC	0.1 SOD-rich MPC	0.2 SOD-rich MPC	0.3 SOD-rich MPC	0.4 SOD-rich MPC	0.5 SOD-rich MPC	1.0 SOD-rich MPC				
SOD (U.mgpt ⁻¹)	Before	26.51 ± 1.35 B	39.96 ± 17.16	27.82 ± 4.16 B	26.18 ± 1.39	33.66 ± 2.92 B	49.98 ± 14.39	33.07 ± 7.28 B	0.001	0.968	0.925	0.110
	After	39.04 ± 10.84 A	33.58 ± 2.46	37.48 ± 8.15 A	37.86 ± 13.23	40.62 ± 2.69 A	45.79 ± 8.66	56.53 ± 8.54 A	0.015	0.348	0.504	0.223
	P value	0.038	0.409	0.036	0.053	0.004	0.558	0.009				
CAT (U.mgpt ⁻¹)	Before	2.97 ± 1.73	3.08 ± 1.86	2.95 ± 1.23	2.42 ± 0.62	3.48 ± 1.41	2.97 ± 0.82	2.42 ± 0.46	0.842	0.834	0.457	0.287
	After	3.11 ± 0.97	3.48 ± 1.05	3.05 ± 0.85	3.29 ± 1.61	3.46 ± 0.87	3.83 ± 1.21	3.46 ± 1.45	0.927	0.737	0.877	0.630
	P value	0.869	0.658	0.877	0.265	0.979	0.188	0.266				
GPx (U.mgpt ⁻¹)	Before	2.65 ± 1.47	2.40 ± 0.97	2.75 ± 1.35	2.50 ± 1.39	3.04 ± 1.68	2.41 ± 0.33	1.96 ± 0.64	0.903	0.592	0.615	0.909
	After	2.73 ± 0.9	3.17 ± 0.9	2.37 ± 1.34	2.74 ± 1.17	2.73 ± 0.94	2.72 ± 0.17	2.83 ± 1.35	0.928	0.750	0.864	0.516
	P value	0.918	0.190	0.639	0.761	0.708	0.127	0.309				
GR (U.mgpt ⁻¹)	Before	0.179 ± 0.03 B	0.199 ± 0.02 B	0.217 ± 0.07 B	0.222 ± 0.01 B	0.253 ± 0.04 B	0.244 ± 0.05 B	0.226 ± 0.06 B	0.109	0.006	0.894	0.657
	After	0.509 ± 0.04 A	0.498 ± 0.02 A	0.514 ± 0.02 A	0.510 ± 0.04 A	0.549 ± 0.01 A	0.516 ± 0.05 A	0.498 ± 0.02 A	0.242	0.042	0.120	0.721
	P value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003				
MDA (mg/kg ⁻¹)	Before	0.090 ± 0.09 B	0.080 ± 0.07 B	0.077 ± 0.04 B	0.079 ± 0.08 B	0.046 ± 0.02 B	0.060 ± 0.05 B	0.038 ± 0.03 B	0.848	0.340	0.638	0.643
	After	0.315 ± 0.13 A	0.322 ± 0.16 A	0.298 ± 0.20 A	0.271 ± 0.08 A	0.246 ± 0.10 A	0.257 ± 0.11 A	0.220 ± 0.06 A	0.843	0.263	0.738	0.845
	P value	0.006	0.013	0.044	0.002	0.004	0.015	0.006				

SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; MDA: malondialdehyde. Means and *SD* – maximum of six replicates.

Uppercase letters compare the antioxidant response of fish in the same treatment before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by T test ($P < 0.05$).

Lowercase letters compare the antioxidant response of fish between treatments before and after subjected heat/dissolved oxygen-induced stress by Tukey test ($P < 0.05$).

0.0 SOD-rich MPC: control 0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet; 0.1 SOD-rich MPC: 0.1% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.2 SOD-rich MPC: 0.2% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.3 SOD-rich MPC: 0.3% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.4 SOD-rich MPC: 0.4% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet, 0.5 SOD-rich MPC: 0.5% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet and 1.0 SOD-rich MPC: 1.0% supplementation of melon pulp concentrate kg⁻¹ diet.

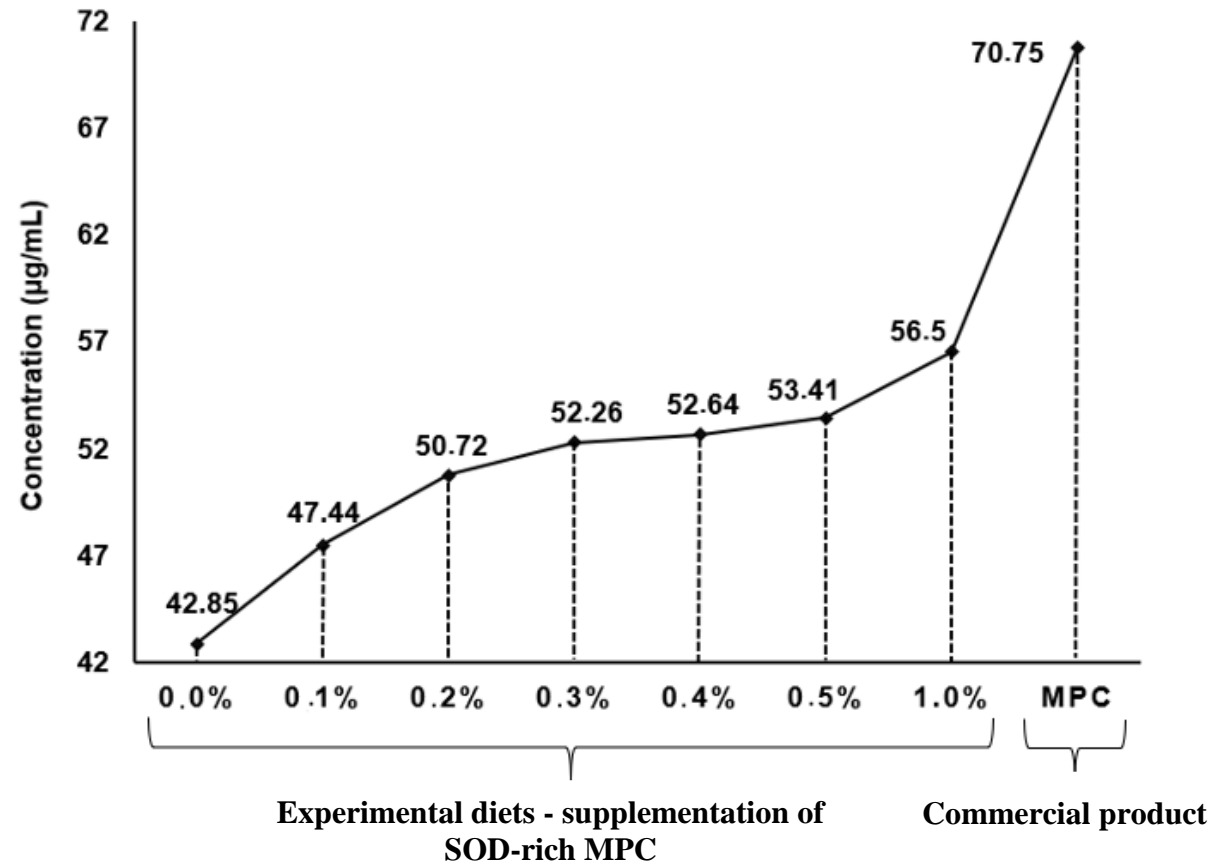


Figure 1. Superoxide anion radical scavenging activity in diets for juveniles Nile tilapia.

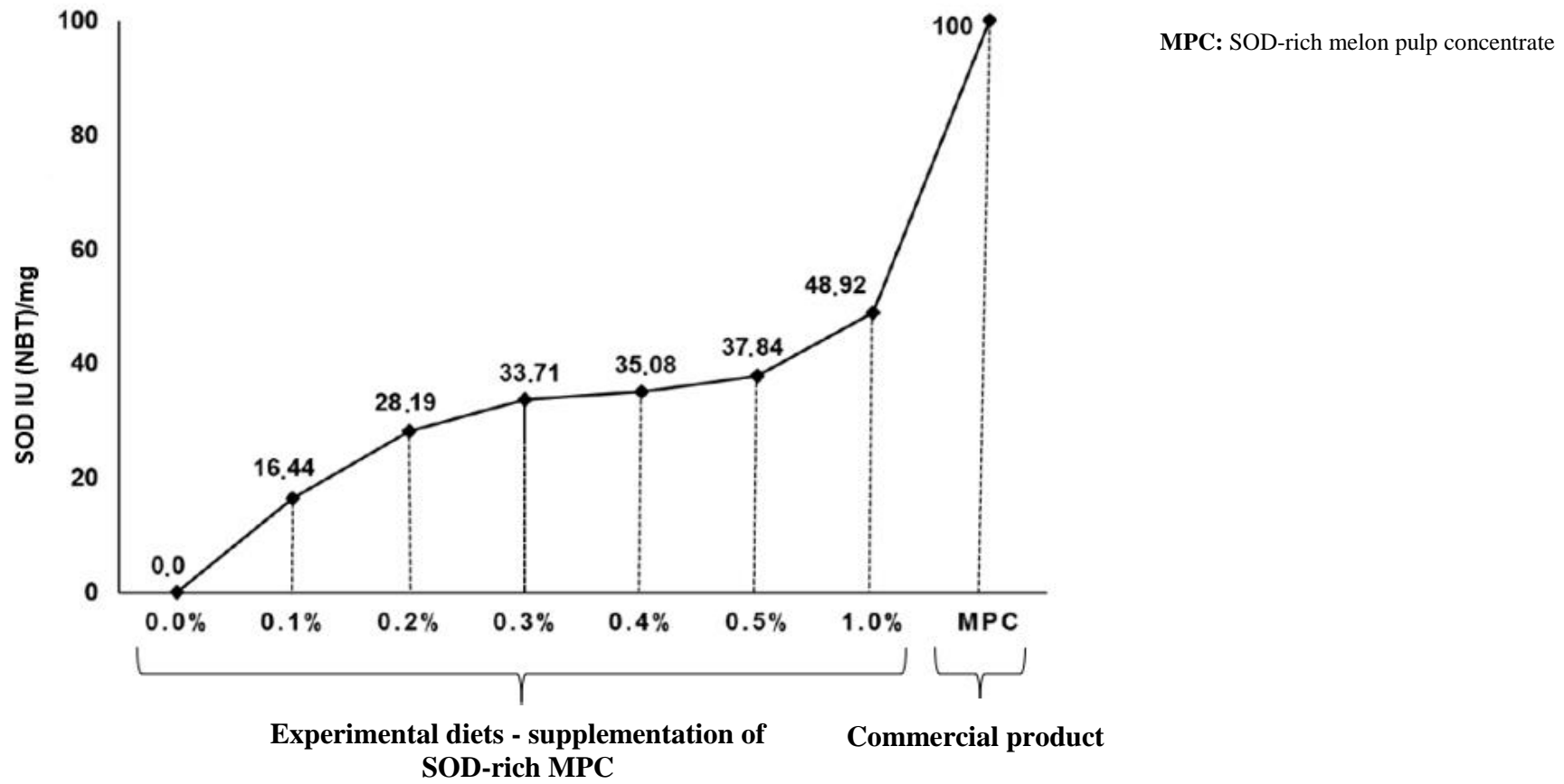


Figure 2. Activity superoxide dismutase in diets for juveniles Nile tilapia.

Capítulo III

Implicações

Atualmente a redução do uso de antibióticos na produção aquícola em muitos países foi determinada como questão urgente, portanto a utilização de aditivos naturais e subprodutos agroindústrias encoraja fortemente sua regulamentação. A utilização destes em dietas pode melhorar a rentabilidade da produção, promover o seu uso frente a desafios impostos pelo cultivo, além de favorecer a redução dos impactos ambientais. Desta forma, o estudo de aditivos naturais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias contendo superóxido dismutase tornaram-se interessantes devido ao seu uso profilático durante condições de estresse em animais.

A utilização do concentrado de polpa de melão promoveu melhora na saúde, o qual foi comprovada pela maior produção da enzima superóxido dismutase, responsável por neutralizar a ação dos radicais livres. Os resultados obtidos nesse estudo são interessantes uma vez que, até o presente momento trabalhos não foram realizados buscando avaliar o desempenho produtivo e atividade das enzimas antioxidantes de peixes alimentados com dietas contendo o concentrado da polpa de melão.

Vale ressaltar que o experimento foi realizado utilizando-se dietas extrudadas, uma vez que, dietas para peixes são, em sua maioria, comercializadas desta forma, podendo a polpa de melão ser incorporada após seu processamento, a partir do banho com óleo de soja e carboximetilcelulose, sendo eficiente na incorporação do produto após processamento.

Desta forma, fica evidenciada a possibilidade de uso do concentrado de polpa de melão como aditivo funcional, pela indústria de dietas para tilápia-do-Nilo, e sua incorporação após processamento das rações.