

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

Efeito da suplementação dietética com fragmento de casca de laranja, zinco e vitaminas E e C no desempenho produtivo, atividade do sistema antioxidante, respostas hematológicas e imunológicas da tilápia-do-Nilo submetida aos desafios térmico, bacteriano e transporte

IGOR SIMÕES TIAGUA VICENTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

BOTUCATU – SP

JANEIRO -2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

Efeito da suplementação dietética com fragmento de casca de laranja, zinco e vitaminas E e C no desempenho produtivo, atividade do sistema antioxidante, respostas hematológicas e imunológicas da tilápia-do-Nilo submetida aos desafios térmico, bacteriano e transporte

IGOR SIMÕES TIAGUA VICENTE

ORIENTADORA: Prof^ª. Ass. Dra. Margarida Maria Barros
CO-ORIENTADORAS: Prof^ª. Adj. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Prof^ª. Dra. Maria Helena Tabuaço Rego Martins Peres

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

BOTUCATU – SP

JANEIRO -2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vicente, Igor Simões Tiagua.

Efeito da suplementação dietética com fragmento de casca de laranja, zinco e vitaminas E e C no desempenho produtivo, atividade do sistema antioxidante, respostas hematológicas e imunológicas da tilápia-do-Nilo submetida aos desafios térmico, bacteriano e transporte / Igor Simões Tiagua Vicente. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Margarida Maria Barros

Coorientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Maria Helena Tabuaço Rego Martins Peres

Capes: 50400002

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Estresse oxidativo. 3. Antioxidantes.
4. Suplementos nutricionais.

Palavras-chave: Desafio bacteriano; Estresse oxidativo; Estresse por transporte.

BIOGRAFIA

Igor Simões Tiagua Vicente, filho de Arivaldo Tiagua Vicente e Mary Ferreira Simões, nasceu no município de São Paulo, SP, no dia 05 agosto de 1991. Aos 18 anos ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) pertencente a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Botucatu, a qual foi concluída em dezembro de 2014.

Em março de 2015, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia – FMVZ – UNESP câmpus Botucatu, nível Mestrado, no qual desenvolveu seu projeto de pesquisa no Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri, orientado por Prof^a Ass. Dra Margarida Maria Barros e co-orientado por Prof^a Adj. Dra. Luciana Francisco Fleuri. Defendeu a dissertação no dia 19 de maio de 2017 intitulada “Uso do frit de laranja em dietas para tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo e sistema antioxidante”, a qual originou o artigo científico publicado no periódico *Aquaculture Research* (IF 1.748) com o título “Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress” (DOI: 10.1111/are.13870).

Em agosto de 2017 ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia – FMVZ – UNESP câmpus Botucatu, nível Doutorado, no qual desenvolve seu projeto de pesquisa no Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri, orientado por Prof^a Ass. Dra Margarida Maria Barros e co-orientado por Prof^a Adj. Dra. Luciana Francisco e Prof^a. Dra. Maria Helena Tabuaço Rego Martins Peres. Seu estudo tem como foco avaliar o possível sinergismo do fragmento de casca de laranja com vitaminas e minerais em dietas para tilápia-do-Nilo.

**“Tudo tem seu apogeu e seu declínio...É natural que seja assim, todavia,
quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a
vida ressurge, triunfante e bela!...Novas folhas, novas flores, na
infinita benção do recomeço”**

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Arivaldo Tiagua Vicente e Mary Ferreira Simões,

Por serem meus exemplos de força e perseverança.

À minha tia,

Márcia Ferreira Simões,

Por todo incentivo durante toda essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Olorum, orixás e guias espirituais, por toda a força, paciência e ajuda me dada durante essa trajetória.

À minha família, por sempre me incetivarem, acreditarem em mim e me fazer acreditar no meu potencial, por sempre se preocuparem com a minha formação, me proporcionarem tudo de melhor, por sempre serem meu porto seguro.

À minha orientadora, Prof^ª. Ass. Dra. Margarida Maria Barros, obrigado.

Ao meu namorado, Carlos Eduardo Fonseca Alves, por tudo que nós passamos durante esses 8 anos, por estar sempre ao meu lado nos momentos felizes e tristes, por me ajudar sempre que preciso, por me acalmar nos momentos de crise de ansiedade, por ser um exemplo de profissional.

Às minhas co-orientadoras, Prof^ª Adj. Dra. Luciana Francisco e Prof^ª. Dra. Maria Helena Tabuaço Rego Martins, por toda contribuição para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela amizade, risadas, companheirismo, por toda contribuição para realização desse trabalho.

À todos os alunos do laboratório AquaNutri, obrigado.

Aos meus irmãos que a vida me deu, Jessica Moraes Cruvinel, Matheus Gardim Guimarães e William dos Santos Xavier, por todas as alegrias e risadas, pelos inúmeros puxões de orelha, por acreditarem que eu conseguiria finalizar esse trabalho, por me apoiar nos momentos em que quis desistir do doutorado e me mostrarem que era possível seguir em frente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo:

2018/19865-5) pelo financiamento da pesquisa.

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

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

SUMÁRIO

Resumo	9
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
CAPÍTULO I	
1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Resíduo do processamento da laranja na alimentação animal	15
1.2 Zinco, vitamina E, vitamina C e flavonóides no sistema antioxidante	16
1.3 Estresse em peixes e consequências fisiológicas	21
1.4 <i>Aeromonas hydrophila</i>	25
2. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	
ABSTRACT	37
1. Introduction	38
2. Material and Methods	40
2.1. <i>Experimental diets (Phases I and II)</i>	40
2.2. <i>DPPH and FRAP in OPF and diets</i>	41
2.3. <i>Determination of total phenols (TP), total flavonoids (TF) in OPF and diets</i>	42
2.4. <i>Feeding trial (Phase I)</i>	42
2.5. <i>Stress and analyses</i>	43
2.6. <i>Heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS) (Phase II)</i>	44
2.7. <i>Transport induced-stress (Phase II)</i>	45
2.8. <i>Bacterial challenge (Phase II)</i>	45
2.9. <i>Hematological assay (Phases I and II)</i>	46
2.10. <i>Immunological assay (Phases I and II)</i>	46
2.11. <i>Antioxidant Enzyme Activity (Phases I and II)</i>	47
2.12. <i>Fillet lipid peroxidation (Phases I and II)</i>	48
2.13. <i>Statistical analysis</i>	50
2.14. <i>Ethics statement</i>	50

3. Results	50
3.1. <i>Growth performance</i>	50
3.2. <i>Hematological parameters before and after challenges</i>	51
3.3. <i>Immunological parameters</i>	51
3.4. <i>Liver antioxidant enzymes activity</i>	52
3.5. <i>Fillet lipid peroxidation</i>	53
4. Discussion	54
5. Acknowledgments	59
6. References	71
CAPÍTULO III	
IMPLICAÇÕES	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de interação das enzimas do sistema antioxidante, vitaminas C e E na eliminação das espécies reativas ao oxigênio.....	18
Figura 2 – Molécula da hesperidina.	21
Figura 3 – Ação das enzimas do sistema antioxidante.	23

LISTA DE TABELAS

Table 1. Formulation and antioxidant capacity of the experimental diets	60
Table 2. Initial body weight (IBW), final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FRC), specific growth rate (SGR) of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc for 100 days.	61
Table 3. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress.....	62
Table 4. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to transport induced stress.	63
Table 5. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to bacterial challenge.....	64
Table 6. Immunological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to bacterial challenge.....	65
Table 7. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS)	66
Table 8. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to transport induced stress.....	67
Table 9. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to bacterial challenge.	68

RESUMO GERAL DA TESE

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do sinergismo entre o fragmento de casca de laranja (OPF), vitaminas C (Vit. C) e E (Vit. E) e zinco (Zn), no desempenho produtivo, parâmetros hematológicos, atividade das principais enzimas do sistema antioxidante, expressão gene Nrf2 e peroxidação lipídica da tilápia-do-Nilo submetida aos desafios térmico/hipóxia, transporte e infecção bacteriana. Um grupo de 800 juvenis de tilápia-do-Nilo ($2,7 \text{ g} \pm 0,03$) foram distribuídos em 40 aquários de 250 L (20 peixes / aquário) e foram alimentados como oito dietas experimentais OPF, OPF + Vit. C, OPF + Vit. E, OPF + Zn, Vit. C + Vit. E, Vit. C + Zn, Vit. E + Zn, OPF + Vit. C + Vit. E + Zn por 100 dias. As dietas foram formuladas para conter 30% de proteína bruta e 18 MJ kg^{-1} de energia bruta. Após o desempenho produtivo os peixes foram submetidos a diferentes estresses. Um grupo foi submetido ao estresse térmico (34°C) por dois dias, outro grupo foi submetido ao estresse por transporte durante quatro horas e o último grupo foi submetido a infecção bacteriana por 15 dias. O perfil hematológico, atividade das principais enzimas do sistema antioxidante, expressão do gene Nrf2 e peroxidação lipídica foram determinados antes e após os estresses, excetuando-se os parâmetros imunológicos que foram determinados apenas após a infecção bacteriana. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido de médias pelo teste de Tukey para determinar o efeito significativo entre o tratamentos ($P < .05$). Foi utilizado test t, para comparar os dados determinados antes e após os desafios. Não houve diferença estatística no desempenho produtivo. Os peixes submetidos ao estresse térmico/hipóxia e transporte, mantiveram os valores hematológicos dentro do preconizado para espécie saudável. Após a infecção bacteriana, os peixes apresentaram quadro de anemia e aumento da resposta imunológica. Houve alteração da atividade das enzimas do sistema antioxidante das tilápias-do-Nilo em todos os desafios impostos. Em conclusão, a suplementação dietética

de OPF + Vit. C + Vit. E + Zn demonstrou ação sinérgica e promoveu melhora do sistema imune e antioxidante e, menor peroxidação lipídica e manutenção dos parâmetros hematológicos sob condições estressoras.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes hepáticas, desafio bacteriano, estresse oxidativo, estresse por transporte, perfil hematológico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the synergistic effect of orange peel fragment (OPF), vitamins C (Vit. C) and E (Vit. E) and zinc (Zn) on growth performance, hematological profile, immunological parameters, Nrf2 gene expression, antioxidant enzyme activity and fillet lipid peroxidation of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS), transport-induced stress (TIS) and *Aeromonas hydrophila* infection. A group of 800 male Nile tilapia ($2.7 \text{ g} \pm 0.03$) was randomly distributed in 40 250-L aquaria (20 fish / tank) and fed eight practical diets OPF, OPF + Vit. C, OPF + Vit. E, OPF + Zn, Vit. C + Vit. E, Vit. C + Zn, Vit. E + Zn, OPF + Vit. C + Vit. E + Zn for 100 days. The diets were formulated to contain 30% crude protein and 18 MJ kg^{-1} crude energy. After feeding period, five fish per treatment were sampled for hematological profile, immunological parameters, antioxidant enzyme activity, Nrf2 gene expression and fillet lipid peroxidation. Then, three different groups of fish were subjected to different types of stress: one group was subjected to HDOIS (34°C) for two days, another group was subjected to TIS for four hours, and the other group was subjected to bacterial infection for 15 days. Hematological profile, antioxidant enzyme activity, Nrf2 gene expression and fillet lipid peroxidation were determined before and after all types of stress, along with the immunological parameters that was determined only for fish subjected to bacterial infection. The fish subjected to HDOIS and transport, kept the hematological profile within the normal range for healthy Nile tilapia. After bacterial infection, the fish showed anemia but better immunological parameters. There was an increase in antioxidant enzymes activity from Nile tilapia in all the challenges. In conclusion, dietary supplementation of OPF + Vit. C + Vit. E + Zn had a synergistic effect by improving antioxidant enzymes activity, immunological parameters, decreasing lipid peroxidation

and maintaining hematological parameters under stress conditions.

Keywords: bacterial challenge, hematological profile, hepatic antioxidant enzyme, oxidative stress, transport induced stress.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O **Capítulo I** aborda as principais características do fragmento de casca de laranja, vitamina C, vitamina E e zinco nas dietas para peixes. Frente aos desafios existentes da piscicultura moderna, se faz necessário o uso de dietas que atendam às exigências nutricionais dos animais, para que se possa garantir respostas fisiológicas positivas, tanto para crescimento como para a saúde. Também nesse capítulo são apresentados os desafios presentes na produção de peixes, a interferência na saúde dos animais e, como cada nutriente estudado atua no combate ao estresse oxidativo e na resposta imune.

Com base nas informações apresentadas no Capítulo I, o estudo apresentado no **Capítulo II** teve como objetivo avaliar a ocorrência de efeito sinérgico entre as suplementações de fragmento de casca de laranja, vitamina C, vitamina E e zinco em dietas para tilápia-do-Nilo. Para tal foram avaliados o desempenho produtivo, perfil hematológico, atividade das principais enzimas do sistema antioxidante, expressão do gene Nrf2 e parâmetros do sistema imunológico dos peixes submetidos aos estresses de transporte, térmico/hipóxia e infecção bacteriana.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Resíduo do processamento da laranja na alimentação animal

Pertencente à família Rutaceae, as laranjas são frutos anatomicamente classificados como hesperídios, sincárpicos, carnudos e indeiscentes (VIDAL;VIDAL, 2006). Possuem em seu epicarpo quantidades elevadas de glândulas oleaginosas, das quais é extraído o óleo essencial de laranja. Após o processamento para obtenção do suco de laranja, são gerados três tipos de resíduos, sendo eles: bagaço, sementes e o fragmento de casca que é a parte mais externa do epicarpo da fruta. Este fragmento recebe o nome de frit de laranja, diferenciando-o da casca da laranja (DELGADO; FLEURI, 2015).

Segundo o USDA (2019), a produção mundial de citrus na safra 2018/2019 aumentou 6% em relação ao ano de 2016, sendo que a laranja representou 61% do total da produção e, assim, se tornou a fruta cítrica de interesse comercial com maior produtividade. Aproximadamente 70% da colheita mundial de laranja é destinada à produção de suco, produtos desidratados e agentes aromatizantes (USDA, 2019). O Brasil é o maior produtor mundial da fruta e do suco de laranja, sendo que contribui com 47% do total de suco de laranja produzido no mundo. A extração de suco de laranja gera anualmente 60 milhões de toneladas de resíduos como cascas e sementes (MARTIN et al., 2010).

Os compostos presentes no fragmento de casca de laranja se alteram de acordo com a variedade da laranja, porém são encontrados em geral flavonóides, vitaminas A, C e E, terpenos, pectinas, além de microminerais como selênio, zinco, cobre, ferro e manganês, todos relacionados à proteção do fruto, por exemplo contra as consequências da incidência de raios solares que favorecem a oxidação (ZOU et al., 2016). Os compostos bioativos extraídos desta fruta atuam como agentes antioxidantes, anticarcinogênicos e

anti-inflamatórios (BENAVENTE-GARCIA; CASTILO, 2008). Dentre esses compostos, os flavonóides são de grande interesse para alimentação animal. Como exemplo destaca-se a hesperidina, que tem a capacidade de induzir a atividade das enzimas antioxidantes. Este resultado foi confirmado por Vicente et al. (2019), em estudo com juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) arraçados com dietas contendo fragmento de casca de laranja e submetidos à estresse térmico/hipóxia. A inclusão dietética do fragmento de casca de laranja determinou maior atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado dos peixes após o desafio térmico. A capacidade antioxidante da hesperidina e do fragmento de casca de laranja tem sido descrita para outros animais de produção, os quais apresentaram maior atividade das enzimas do sistema antioxidante, como para frangos de corte (AKBARIAN et al., 2015, OGNIK et al., 2016), galinhas poedeiras (ISKENDER et al., 2016) e ratos (SELMİ et al., 2017).

Os compostos encontrados na laranja tais como vitaminas, minerais e flavonóides podem atuar na resposta antioxidante de forma isolada, entretanto possuem maior ação contra oxidação quando atuam em sinergismo. Por exemplo: a vitamina C age como doadora de hidrogênio para recuperação do tocoferol e, assim, pode manter a vitamina E ativa para desempenhar sua ação antioxidante, tanto na proteção das células como na proteção de flavonóides e carotenóides. (AMITAVA; KIMBERLY, 2014). Desta forma estabelece-se a capacidade antioxidante das frutas cítricas, com destaque para as laranjas (ZOU, et al., 2016)

1.2 Zinco, vitamina E, vitamina C e flavonóides no sistema antioxidante

O metabolismo oxidativo tem como prioridade a produção de energia para as atividades celulares essenciais, entretanto esses processos geram como produto de reação

os radicais livres, que são oriundos do metabolismo normal, porém devem ser controlados, pois podem provocar danos às células. Esse processo pode ocorrer em diferentes locais dentro das células, a saber: cadeia transportadora de elétrons, atividade do citocromo P-450 e na fagocitose pelos macrófagos na defesa do organismo (ABATE et al., 1990).

Em vista disso é necessário efetivo sistema de eliminação dos metabólitos do oxigênio, sendo esta a função do sistema antioxidante. A produção dos compostos antioxidantes corresponde às necessidades do organismo e está sujeito a regulação ativa, pois o nível de antioxidantes sistêmicos está relacionado a fatores como: absorção, síntese, transporte e metabolização de nutrientes com ação antioxidante que não são sintetizados no organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Nos organismos em geral, os compostos antioxidantes podem ser classificados em grupos de diferentes pesos moleculares (LIVINGSTONE, 2001). O primeiro grupo é o de baixo peso molecular, que possui em sua estrutura compostos solúveis em água, tais como glutatona reduzida, ácido ascórbico, além de moléculas lipossolúveis como corotenóides, retinol e tocoferol. Esses compostos participam do sequestro de radicais livres e atuam, ainda, como cofatores de reação. O segundo grupo são os de alto peso molecular e consiste em proteínas específicas ou não específicas. As específicas incluem as enzimas com atividade antioxidante, superóxido dismutase (EC 1.15.1.1), catalase (EC 1.11.1.6), glutatona peroxidase (EC 1.11.1.9) e glutatona redutase (EC 1.8.1.7) (Figura 1), sendo as não específicas representadas por proteínas com íons de transição, como a ferritina.

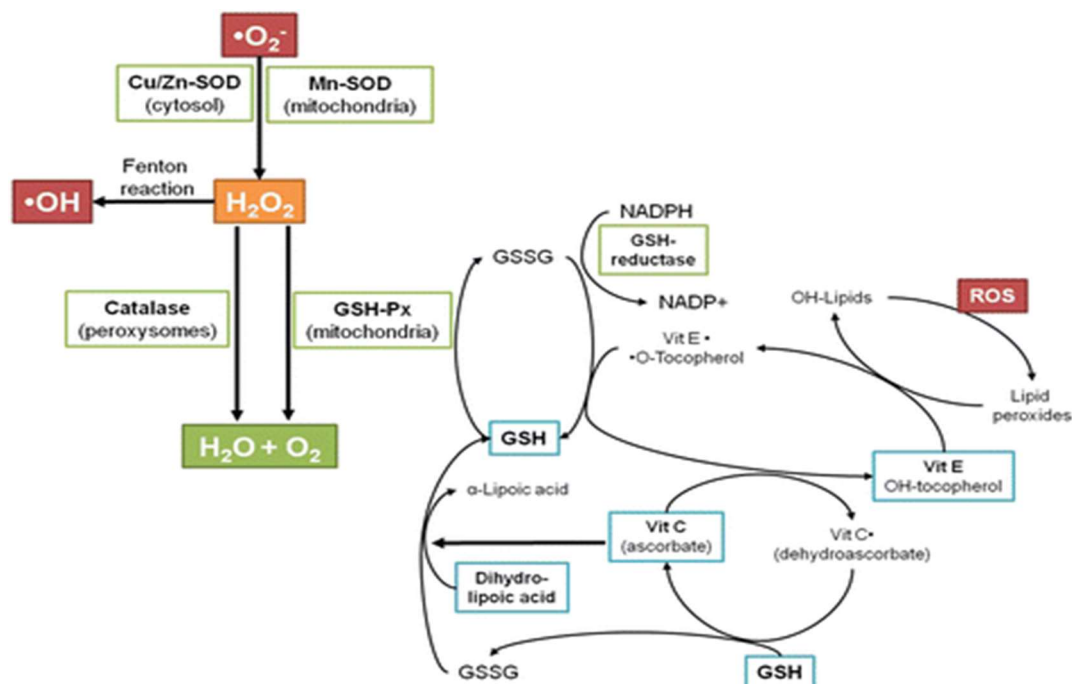


Figura 1 – Mapa de interação das enzimas do sistema antioxidante, vitaminas C e E na eliminação das espécies reativas ao oxigênio. (Fonte: Pisoschi; Pop 2015)

Os micronutrientes compreendem minerais, vitaminas e flavonóides e são essenciais para que os animais possam manter o bom funcionamento dos processos biológicos (NRC, 2011) como, por exemplo, atividade adequada do sistema imunológico e sistema antioxidante e, assim, garantir a higidez do organismo (MURALISANKAR et al., 2015). Entretanto, a utilização desses nutrientes em níveis não adequados pode afetar sua biodisponibilidade devido interações antagônicas existentes.

Dentre os microminerais, o zinco é essencial para manter a estabilidade da membrana celular, é componente dos tecidos animais, possui importante participação na síntese celular, metabolismo de carboidratos, sistema imunológico e sistema antioxidante (HARDY, 2001). O nível de zinco no organismo é regulado por proteínas como metalotioneínas responsáveis pela liberação e expressão gênica de proteínas transportadoras de zinco (ZnT), sendo este processo relacionado ao consumo desse mineral. Segundo Underwood (1962), no sangue o zinco é encontrado no interior dos

eritrócitos e está relacionado à defesa das células contra oxidação, já que esse mineral atua como cofator da enzima superóxido dismutase. A SOD cataliza a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que poderá ser eliminado por ação das enzimas catalase e glutathione peroxidase (LEHNINGER et al., 1995) e, assim, proporciona eliminação dos radicais livres, que são responsáveis pela peroxidação lipídica da membrana celular. Hidalgo et al. (2002) demonstraram que a deficiência de zinco na dieta para truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase. Para a mesma espécie, Knox et al. (1984) demonstraram que a suplementação de zinco na dieta elevou a atividade da SOD. Este mineral também possui interações com outros minerais e vitaminas, como por exemplo a vitamina E. Segundo Kim et al. (1998), a deficiência de zinco no organismo pode diminuir a absorção de vitaminas lipossolúveis (A e E) nos enterócitos, devido a alteração na formação dos quilomicrons.

Vitamina E é o termo utilizado para designar grupo de compostos lipossolúveis como tocoferóis e tocotrienóis, sendo responsáveis pela proteção da membrana lipoproteica celular e dos ácidos graxos poli-insaturados contra oxidação, devido a existência do grupamento hidroxila em sua estrutura química. Essa vitamina tem a capacidade de doar seu hidrogênio fenólico para os radicais livres (COMBS Jr, 1992). Assim, como em outros animais, nos peixes a vitamina E também é responsável por modular o sistema imunológico sob condições de infecção bacteriana (VERLHAC TRICHET, 2010).

Para o ótimo funcionamento do sistema antioxidante se faz necessária interações entre nutrientes como, por exemplo, a recuperação do α -tocoferol. Essa interação ocorre com a vitamina C, que atua como cofator de reações de hidroxilação. Portanto, o α -tocoferil é recuperado para sua forma redutora, α -tocoferol e, assim, reestabelece o

potencial redutor da vitamina E (McDOWELL, 2000).

Dentre os animais, os peixes não possuem a capacidade de sintetizar o ácido ascórbico à partir da glicose devido a ausência da enzima L-gulonolactona oxidase. Por isso, a necessidade de suplementação desta vitamina em dietas para peixes, de modo que esses animais possam exercer suas atividades metabólicas e manter a homeostase (LEHNINGER et al., 1995; NRC, 2011; CHEN, et al., 2004).

As interações dessas vitaminas, também têm eficácia no sistema imune, sendo que níveis ótimos de vitamina C e E atuam na proteção de compostos do sistema imunológico (ORTUNO et al., 2000). O incremento do nível dietético da vitamina C melhora a resistência contra infecções pelo aumento benéfico da ação do sistema imune não específico, no caso o sistema complemento (BLAZER, 1992).

Diferentemente dos minerais e vitaminas, os flavonóides ainda não possuem sua ação antioxidante bem estabelecida em peixes, mas sabe-se que devido suas características químicas têm a capacidade de proteger as membranas celulares contra a peroxidação, além de agir na prevenção de apoptoses e também na regulação gênica (KIRON, 2012). Os flavonóides representam o maior grupo de compostos polifenólicos, são basicamente estruturas de três anéis, sendo dois deles de benzenos aromáticos (anéis A e B), ligados por um anel pirano (anel C) (BENAVENTE-GARCIA; CASTILO, 2008). Ainda relacionado a sua estrutura química estes compostos possuem o número e a posição dos grupamentos hidroxilas, a presença de ligações duplas e a característica de deslocar elétrons determinam a capacidade dos flavonóides de eliminar os radicais livres (LEICACH;CHLUDIL, 2014). Os flavonóides participam também de outros mecanismos para exercerem sua atividade antioxidante como por exemplo, interação com componentes da membrana celular e ativação de enzimas (FRAGA, et al., 2010). Dentre os flavonóides presentes na laranja, a hesperidina (Figura 2) é mais comumente

encontrada nas diferentes variedades desse fruto (ZOU et al., 2016). Esta molécula é encontrado em maior concentração na casca em relação ao suco e sementes, uma vez ser este composto responsável pela coloração do fruto (COLL et al., 1998). A hesperidina tem como funções regular a expressão do gene Nrf2, responsável pela regulação da atividade das enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase e glutaciona redutase e, também, atua na redução dos intermediários reativos ao nitrogênio (PARHIZ, et al., 2015).

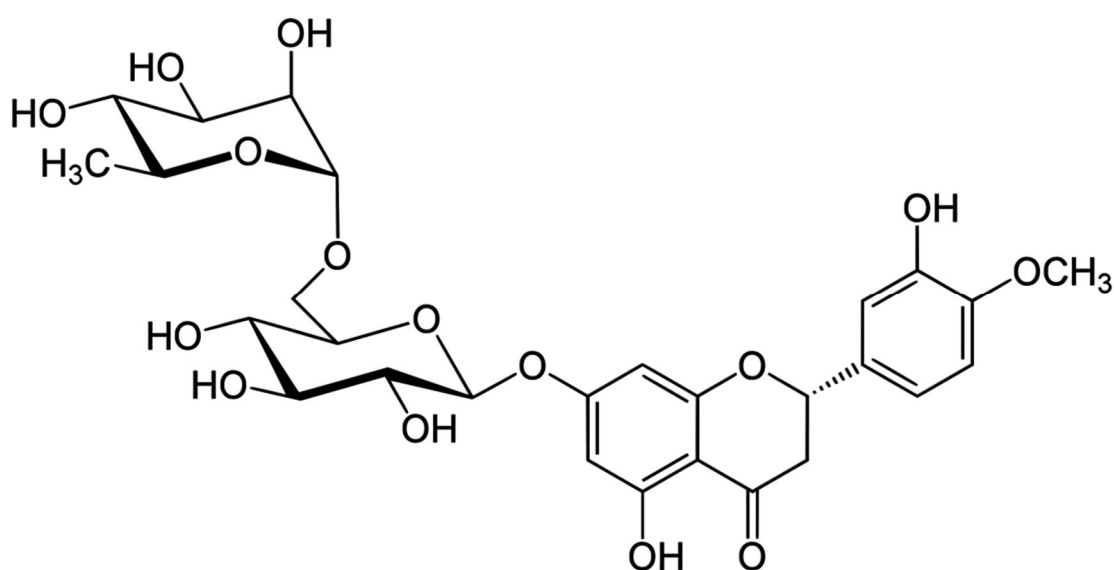


Figura 2 – Molécula da hesperidina. (Fonte: Lebreton, 1928).

1.3 Estresse em peixes e consequências fisiológicas

A intensificação da produção aquícola pode desencadear situações estressantes para os animais. Este estado fisiológico, denominado estresse, é definido por conjunto de respostas fisiológicas não-específicas do organismo às situações que tendem a desequilibrar a homeostase e, assim, podem proporcionar acometimento dos peixes por microrganismos o que, conseqüentemente, compromete a saúde dos animais (BARROS et al., 2014).

Segundo Tort (2011), os estressores podem ser classificados por diferentes critérios, como origem ou fonte, percepção ou duração. As respostas ao estresse podem ser diferentes no que se refere à saúde dos peixes, pois dependem diretamente das características do estressor, especificamente a intensidade e tempo. Entretanto em todos os casos a resposta ativará mecanismos fisiológicos para o retorno à homeostase. Dentre os principais fatores estressores que podem acometer peixes criados em sistema intensivo de produção ressaltam-se a alta temperatura, o manejo por transporte e a infecção por patógenos.

O estresse térmico afeta direta e indiretamente todos os organismos vivos, entretanto, a alta temperatura influencia criticamente os animais ectotérmicos. O aumento da temperatura estimula os processos metabólicos de acordo com os princípios termodinâmicos. Quando se refere aos peixes, a elevada temperatura da água determina maior consumo de oxigênio e, conseqüentemente, maior metabolização de oxigênio e, assim, produção exacerbada de espécies reativas ao oxigênio, que podem determinar a condição de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011). Além dos danos diretos já citados, indiretamente o aumento da temperatura diminui as taxas de oxigênio dissolvido na água fazendo com que o peixe seja submetido a hipóxia, outro fator estressor (TEIXEIRA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2016; VICENTE et al., 2019; XAVIER et al., 2020).

A falta de oxigênio também pode induzir o estresse oxidativo em peixes. Nessas condições ocorrem alterações nas mitocôndrias das células desses animais, mais especificamente no complexo enzimático xantina redutase/xantina oxidase, com aumento das oxidações da enzima xantina redutase para garantir níveis normais de oxigênio no organismo, sendo que este fato pode acometer maior produção de radicais livres (LUSHCHAK, 2011). Além da produção de EROs proveniente da oxidação desta enzima, pode ocorrer em outros locais da célula como no citocromo P450, NADPH-oxidase e

ciclooxigenase (FORTUÑO et al., 2005) (Figura 3). Esta condição já foi relatada em diferentes espécies de organismos aquáticos com o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante, nos seguintes estudos: CAT em *Carassius auratus* (LUSHCHAK et al., 2001), SOD e CAT em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (LUSHCHAK et al., 2005), GPx em *Leporinus elongatus* (WILHELM FILHO et al., 2005), SOD, CAT e GPx em *Litoperanaeus vannamei* (PARRILLA-TAYLOR; ZENTENO-SAVIN, 2011; TRASVIÑA-ARENAS et al., 2013; KNIFFIN et al., 2014) e SOD, CAT e GPx para tilápia-do-Nilo (VICENTE et al., 2019).

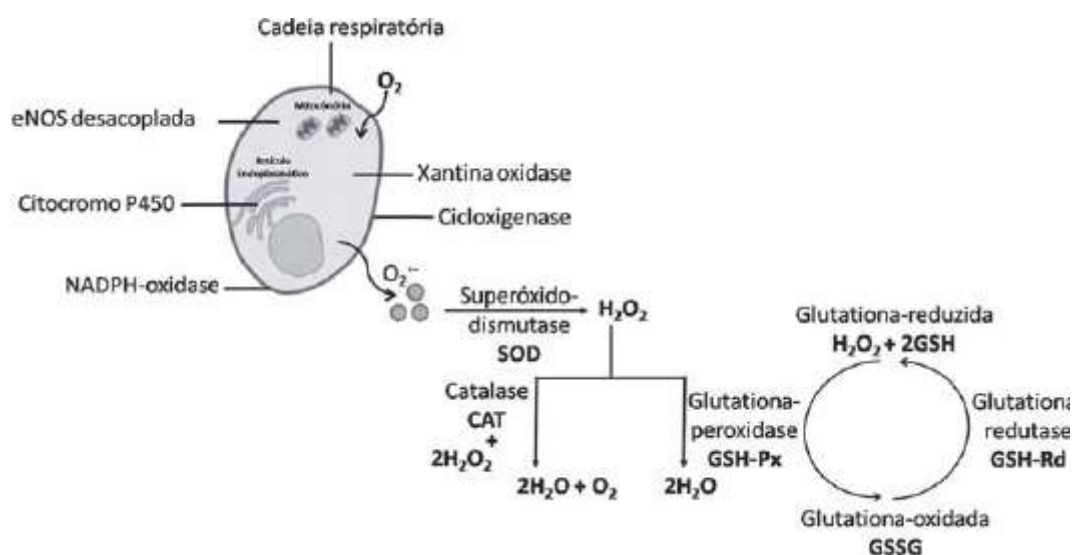


Figura 3 – Ação das enzimas do sistema antioxidante (Fortuño et al., 2005).

Além do estresse oxidativo, os peixes também sofrem alterações nos parâmetros hematológicos quando submetidos ao estresse térmico e hipóxia. Como relatado em estudos com tilápia-do-Nilo observou-se aumento no número e volume de eritrócitos e elevação na taxa de hemoglobina (TEIXEIRA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2016 e VICENTE et al., 2019).

O transporte de peixes é outro fator estressor, pois envolve captura e adensamento dos peixes, mudanças nos parâmetros de qualidade de água e o transporte em si, como

a carga e descarga dos animais (HARMON, 2009; SAMPAIO; FREIRE, 2016). Entretanto, o maior desafio desses animais durante o transporte, mesmo em condições adequadas como em caixas de transporte e com oxigenação controlada, são as alterações da homeostase, frente as condições de qualidade da água, pois aumentam os níveis de NH_3 e NH_4 , bem como excreção de dióxido de carbono (LIM et al., 2003; PATERSON et al., 2003; BECKER et al., 2016). Estas condições podem modificar o pH da água e, por consequência, o metabolismo dos peixes e ativar sistemas fisiológicos em resposta ao estresse. Dentre esses sistemas ativados, pode-se verificar respostas fisiológicas como liberação de catecolaminas, corticóides e aumento dos níveis de glicose no sangue (POTTINGER, 2008; ZEPPENFELD et al., 2014). Além disso, os peixes podem sofrer desequilíbrio osmótico com perdas de íons para o meio em que se encontram (BECKER et al., 2013, 2016; PARODI et al., 2014; ZEPPENFELD et al., 2014; GARCIA et al., 2015; OSTRENSKY et al., 2016).

Em estudo com juvenis de *Colossoma macropomum* foi observado aumento da taxa de hemoglobina, após serem submetidos ao desafio de transporte. Entretanto, Kpundeh et al. (2013), em estudo com tilápia-do-Nilo sob condições de alta estocagem observaram redução no número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina. Segundo Ciji et al. (2015) este fato pode ter ocorrido por ação do nitrito sobre os eritrócitos, o que resultou na formação de metahemoglobina que impossibilita o carreamento de oxigênio e, assim, diminui a taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito e número de células vermelhas. Vale ressaltar que os animais devem estar preparados para prevenir ou reduzir o estresse imposto, sendo que este preparo deve ocorrer com a utilização de dietas espécie específicas, que atendam às exigências nutricionais de saúde, por exemplo, com níveis adequados de minerais e vitaminas, além de alimentos e aditivos funcionais em substituição aos aditivos industriais.

Em função do sistema de intensivo produção tem-se utilizado estratégias nutricionais para favorecer o mecanismo de defesa imunológica dos peixes frente a infecção patogênica. Qualquer desbalanço na formulação da ração ou escolha incorreta dos alimentos pode prejudicar a saúde dos peixes e aumentar a susceptibilidade desses às doenças. Atualmente, o conceito de manter os peixes saudáveis frente a melhora das dietas oferecidas é bem aceito, já que existem evidências científicas ao longo dos anos que comprovam que o uso de aditivos alternativos aos fármacos podem estimular o sistema imunológico dos peixes e, assim, diminuir as perdas na produção aquícola (KIRON, 2012).

Do ponto de vista imunológico, os peixes são considerados a primeira classe de vertebrados com sistemas inatos e adaptativos, entretanto o último sistema é menos efetivo quando comparado aos vertebrados superiores. Nesses animais são considerados como primeira barreira de proteção: a pele, escamas e muco, que por sua vez é constituído por moléculas que possuem ação imune, como por exemplo a lisozima. (KIRON, 2012).

No entanto, devido ao manejo intensivo da piscicultura, essa defesa primária pode ser comprometida por lesões na epiderme, o que proporcionaria acesso dos agentes patogênicos aos tecidos, sendo que, neste caso o sistema inato assumiria a defesa do organismo (KIRON, 2012). A ação do sistema imunológico deve ser eficiente, tanto no local da infecção quanto de forma sistêmica, uma vez que no ambiente aquático os principais agentes infectantes são as bactérias, com destaque para a *Aeromonas hydrophila* (LIM; WEBSTER, 2001).

1.4 *Aeromonas hydrophila*

Dentre os agentes patogênicos responsáveis por causar perdas na aquicultura, se

destacam as bactérias, sendo necessário, portanto, compreender os mecanismos de prevenção e eliminação desse patógeno na produção, pois limita o desenvolvimento da atividade aquícola (FRERICHS; MILLAR, 1993). Essa limitação se dá, uma vez que o peixe está exposto, direta e constantemente, a esses patógenos. Sebastião et al. (2015) isolaram 178 bactérias de tilápia-do-Nilo, tambaqui, carpa comum, cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), de diferentes regiões do Brasil e constataram maior contaminação por *Aeromona hydrophila* no total de 31%. As bactérias do gênero *Aeromonas* podem ser encontradas em diversos habitats como, água, solo e esgotos. No meio aquático são encontrados, principalmente, em ambientes dulcícolas. Assim, os peixes estão sujeitos ao acometimento por essa bactéria, já que o estresse ocasionado devido a intensificação da produção desencadeia desequilíbrio da homeostase e, assim, favorece a infecção por esse agentes patógenos comumente encontrados no ambiente (HIRSCH et al., 2006).

As espécies de bactérias classificadas com gênero *Aeromonas* que causam infecções em peixes de água doce são: *Aeromonas hydrophila*, *A. sóbria* e *A. cavia* (BELEM-COSTA, 2003). Surtos causados por este gênero de bactérias estão associados com estresse, principalmente, altas temperaturas da água e oscilações térmicas (INGLIS et al., 1993). Esses microrganismos são saprófitas, ou seja, utilizam-se da matéria orgânica presente no ambiente aquático para favorecer seu crescimento e multiplicação e, também, constituem parte da microbiota intestinal dos peixes (SWAN; WHITE, 1989).

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é um bacilo gram-negativo, de 0,3-1,0 μm de largura e 1,0-3,5 μm de comprimento e possui flagelo, o que a torna móvel. Crescem em meios de cultura simples, sendo as colônias arredondadas e de coloração creme. Os peixes infectados por essa bactéria apresentam, de modo geral, perda de apetite, desequilíbrio, hemorragias, lesões na epiderme em forma de úlceras com exposição dos tecidos internos e exoftalmia (AUSTIN; AUSTIN, 1993) (Figura 4). Esta bactéria também ataca os órgãos do animais infectados, que apresentam sinais clínicos como órgãos esbranquiçados, necrose de tecidos hematopoiéticos dos rins e baço e intestino flácido com muco amarelado (AUSTIN; AUSTIN, 1993).

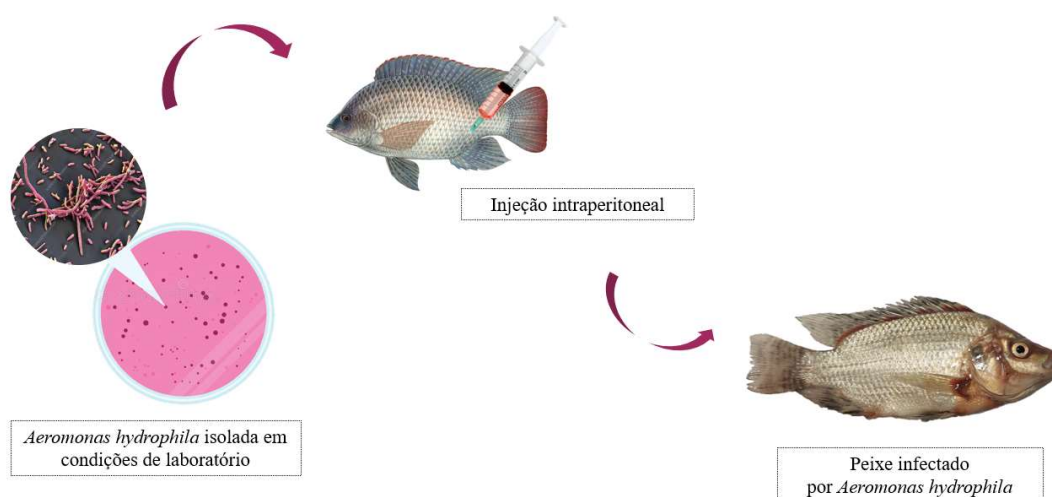


Figura 4: Infecção por *Aeromonas hydrophila*. (Fonte: elaboração dos autores)

Com base nessas informações, o estudo propõe avaliar a possibilidade de efeito sinérgico entre o fragmento de casca de laranja com as vitaminas C e E e o mineral zinco, no desempenho produtivo, perfil hematológico, atividade das enzimas do sistema antioxidante, expressão do gene Nrf2, parâmetros imunológicos e peroxidação lipídica da tilápia-do-Nilo em diferentes condições de estresse.

Capítulo II: “Synergistic effect of dietary orange peel fragment, vitamin C and E and zinc on antioxidant-immune responses of Nile tilapia under stress conditions” foi

redigido de acordo com as normas do periódico **Aquaculture (impact fator 3.022)**.

2. REFERÊNCIAS

ABATE, C. et al., 1990. **Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro**. Science, Washington, v. 249, p. 1157–1161. DOI: 10.1126/science.2118682

AKBARIAN, A. et al. 2015. **Antioxidant enzyme activities, plasma hormone levels and serum metabolites of finishing broiler chickens reared under high ambient temperature and fed lemon and orange peel extracts and *Curcuma xanthorrhiza* essential oil**. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 99, n. 1, p. 150–162. DOI: /10.1111/jpn.12188

AMITAVA D.; KIMBERLY K. 2014. Chapter 15 – **Antioxidant vitamins and minerals**. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, p. 277–294.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. 1993. **Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish**, Second Edition. New York: Ellis Horwood.

BARROS M.M., et al. 2014. **Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed beta-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge**. Fish & Shellfish Immunology, v. 39, n. 2, p. 188-195. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.05.004

BECKER, A. G et al. 2013. **Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen***. Neotropical Ichthyology, v. 11, n. 3, p. 675–681. DOI: 10.1590/s1679-62252013000300021

BECKER, A. G., et al. 2016. **Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 42, n. 1, p. 73–81. DOI: 10.1007/s10695-015-0118-x.

BELEM-COSTA, A. 2003. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica**. 54p. Tese (Doutorado

em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. Journal of agricultural and food chemistry, v. 56, n. 15, p. 6185-6205. DOI: 10.1021/jf8006568

BLAZER, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annual Review of Fish Diseases, v. 2, p. 309-323.

CHEN, R. et al. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). Aquaculture 242.1-4: 553-569. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.09.012

CIJI, A. et al. 2015. Dietary L-tryptophan modulates growth and immunometabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. Aquaculture Research, v. 46, n. 8, p. 2013-2014. DOI: 10.1111/are.12355

COLL, M.D. et al. 1998. Recovery of flavonones from wastes of industrially processed lemons. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, v. 206, n. 6, p. 404–407.

COMBS, G.F., Jr. 1992 Vitamin E, in The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition & Health, pp. 179-203, Academic Press Inc., San Diego.**CONTE, F. S.** Stress and welfare of culture fish. Applied Animal Behavior Science, Oxford, v. 86, p. 205, 2004.

DAMASCENO, F. M. et al. 2016. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. Aquaculture, v. 454, p. 257–264. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.029

DELGADO, C.H.; FLEURI, L.F., 2015 Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description – A review. Food Reviews International, v. 32, n. p. 1-14. DOI: 10.1080/87559129.2015.1041183.

FORTUÑO, A. et al. 2005. **Oxidative Stress and vascular remodelling**. *Experimental Physiology*, Chichester, v. 90, n. 4, p. 457-462. DOI: 10.1113/expphysiol.2005.030098

FRAGA, C.G. et al. 2010. **Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols**. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 435–445. DOI: 10.1016/j.mam.2010.09.006

FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. 1993. **Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens**. Stirling: Pisces Press, 60p.

GARCIA, L. O. et al. 2015. **Net ion fluxes and ammonia excretion during transport of *Rhamdia quelen* juveniles**. *Ciência Rural*, v. 45, n. 10, p. 1854–1858. DOI: 10.1590/0103-8478cr20141420

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. 1999. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press. 936p.

HARDY, R.W., 2001. **Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset and identification**. In: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), *Nutrition and Fish Health*. The Haworth Press, Inc., Binghamton, New York, p. 131–147.

HARMON, T. S. 2009. **Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics**. *Reviews in Aquaculture*, v. 1, n. 1, p. 58–66. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x

HIDALGO, M.C. et al. 2002. **Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, n. 2, p. 183–193. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00105-4

HIRSCH, D. et al. 2006. **Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos**. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217. DOI: 10.1590/S1413-70542006000600026

INGLIS, V. et al. 1993. **Bacterial diseases of fish**. Oxford: Blackwell Scientific.

312p.

ISKENDER, H. et al. 2016. **The effects of dietary flavonoid supplementation on the antioxidant status of laying hens.** Revista Brasileira De Ciência Avícola, v. 18, n. 4, p. 663– 668. DOI: 10.1590/1806-9061-2016-0356

KIM, S. J. et al. 1998. **Production of inducible nitric oxide is required for monocytic differentiation of U937 cells induced by vitamin E-succinate.** Journal of cell science, v. 111, n. 4, p. 435-441.

KIRON V. 2012. **Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care.** Animal Feed Science and Technology, v. 173, n. 1-2, p. 111-133. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015

KNIFFIN, C. D. et al. 2014. **Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: Impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*.** Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology, v. 170, p. 43– 49. DOI: 10.1016/j.cbpb.2014.01.006

KNOX, D. et al. 1984. **Effects of dietary zinc intake upon copper metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** Aquaculture, v. 40, n. 3, p. 199-207. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90187-X

KPUNDEH, M.D. et al. 2013. **Stocking densities and chronic zero culture water exchange stress' effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*).** Journal of Aquaculture Research & Development, v. 4, n. 189, p. 2. DOI: 10.4172/2155-9546.1000189

LEBRETON, P. J. Pharm. Chim., 1928, 14, 337

LEHNINGER, A.L. et al. 1995. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Savier. 463p.

LEICACH, S.R.; CHLUDIL, H.D. 2014. **Chapter 9—Plant secondary metabolites: Structure–activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases.** In Studies in Natural Products Chemistry; Attaur, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. Volume 42, pp. 267–304. DOI: 10.1016/B978-0-444-

63281-4.00009-4

LIM, C.; WEBSTER, C. D. 2001. **Nutrition and fish health**. New York: Haworth Press. p.235-260.

LIM, L. C., et al. 2003. **Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport**. *Aquaculture Research*, v. 34, n. 11, p. 923–935. DOI: 10.1046/j.1365-2109.2003.00946.x

LIVINGSTONE, D. R. 2001. **Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms**. *Marine Pollution Bulletin*, London, v. 42, n. 8, p. 656-666.

LUSHCHAK, V. I. et al. 2001. **Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation**. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 280, n. 1, p. R100– R107. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.1.R100

LUSHCHAK, V. I. et al. 2005. **Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues**. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 37, n. 6, p. 1319-1330. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.01.006

LUSHCHAK, V. I. 2011. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals**. *Aquatic Toxicology*, v. 101, n. 1, p. 13–30. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006

MARTIN, M. 2010. **Orange peel: Organic waste or energetic resource**. *Technologies/systems for different manure and organic waste treatment options*, v. 1, p. 25–28.

McDOWELL, L.R. 2000. **Vitamins in Animal and Human Nutrition**. Comparative aspects to human nutrition. California, Academy Press. 812p.

MURALISANKAR, T., et al., 2015. **Effects of dietary zinc on the growth, digestive enzyme activities, muscle biochemical compositions, and antioxidant status of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii***. *Aquaculture*, v. 448, p. 98–

104. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.045

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011. **Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp National** Academies Press, Washington, DC.

PARHIZ H, et al., 2015. **Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models.** *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 3, p. 323–3. DOI: 10.1002/ptr.5256

PISOSCHI, A. M.; POP, A. 2015. **The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review.** *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74. DOI: doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040

OSTRENSKY, A. et al. 2016. **Use of clove, mint and camphor essential oils on confinement of clown anemonefish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830): anesthetic effects and influence on water quality.** *Journal of Aquaculture Research & Development*, v. 7, n. 457. DOI: 10.4172/2155-9546.1000457

PARODI, T. V. et al. 2014. **Anesthetic activity of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and grey strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 323–334. DOI: 10.1007/s10695-013-9845-z

PARRILLA-TAYLOR, D. P.; ZENTENO-SAVÍN, T. 2011. **Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation.** *Aquaculture*, v. 318, n. 3-4, p. 379–383. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.015

PATERSON, B. D. et al. 2003. **Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma.** *Aquaculture*, v. 218, n. 1-4, p. 717–728. DOI:10.1093/dnares/dst022

POTTINGER, T. G. 2008. **The stress response in fish: mechanisms, effects and measurement.** *Fish Welfare*, p. 32–48. DOI: 10.1002/9780470697610.ch3

OGNIK, K. et al. 2016. **The potential of using plant antioxidants to stimulate antioxidant mechanisms in poultry.** World's Poultry Science Journal, v. 72, n. 2, p. 291– 298. DOI: 10.1017/S0043933915002779

ORTUNO, J et al. 2000 **High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).** Fish & Shellfish Immunology, v. 10, n. 4 p.293-307. DOI: 10.1006/fsim.1999.0238

SAMPAIO, F. D.; FREIRE, C. A. 2016. **An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration.** Fish and Fisheries, v. 17, n. 4, p. 1055–1072. DOI: 10.1111/faf.12158

SEBASTIÃO, F. A. et al. 2015. **Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing.** Advances in Microbiology, v. 5, n. 06, p. 409, 2015. DOI: 10.4236/aim.2015.56042

SELMİ, S., et al. 2017. **Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat.** Lipids in Health and Disease, v. 16, n. 1, p. 152. DOI: 10.1186/s12944-017-0546-y

SWANN, L.; WHITE, D.V.M. 1989. **Diagnosis and treatment of “*Aeromonas hydrophila*” infection of fish.** In: A Guide to Approved Chemical in Fish Production and Fishery Resource Management, University of Arkansas Cooperative Extension Service.

TEIXEIRA, C. P., et al. 2012. **Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress.** Aquaculture Research, v. 43, n. 8, p. 1081– 1088. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02911.x

TORT, L. 2011. **Stress and immune modulation in fish.** Developmental & Comparative Immunology, v. 35, n. 12, p. 1366–1375. DOI: 10.1016/j.dci.2011.07.002

TRASVIÑA-ARENAS, C. H. et al. 2013. **White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and**

reoxygenation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 164, n. 1, p. 44– 52. DOI: 10.1016/j.cbpb.2012.10.004

UNDERWOOD, E.J. 1962. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**, 2nd ed. Academic Press, New York.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE 2019. **Citrus: World Markets and Trade**; Foreign Agricultural Service: Washington, DC, USA.

VERLHAC TRICHET, V. (2010) **Nutrition and immunity: an update**. Aquaculture Research, v. 41, n. 3, p. 356–372. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x

VICENTE, I. S. T. et al. 2019. **Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress**. Aquaculture Research, v. 50, n. 1, p. 80-92. DOI: 10.1111/are.13870

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. 2006. **Botânica organográfica: quadros sinóticos ilustrados e fanerógamos**. Voçosa: Editora UFV.

WILHELM FILHO, D., et al. 2005. **Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847)**. Aquaculture, v. 244, n. 1-4, p. 349–357. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.024

XAVIER, W. et al. 2020. **The putative effect of a SOD-rich melon pulp-concentrate on growth performance and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under heat/dissolved oxygen-induced stress**. Aquaculture 529, 735669. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735669

ZEPPENFELD, C. C., et al. 2014. **Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton**. Aquaculture, v. 418-419, p. 101–107. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.013

ZOU, Z., et al.,2016. **Antioxidant activity of Citrus fruits**. Food Chemistry, v. 196, p. 885–896. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.072

CAPÍTULO II

Synergistic effect of dietary orange peel fragment, vitamin C and E and zinc on antioxidant-immune responses of Nile tilapia under stress conditions

Abbreviations: OPF, orange peel fragment; Vit. C, vitamin C; Vit. E, vitamin E; Zn, zinc; HDOIS, heat/dissolved oxygen-induced stress; TIS, transport induced stress; BC, bacterial challenge

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the synergistic effect of orange peel fragment (OPF), vitamins C (Vit. C) and E (Vit. E) and zinc (Zn) on growth performance, hematological profile, immunological parameters, Nrf2 gene expression, antioxidant enzyme activity and fillet lipid peroxidation of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS), transport-induced stress (TIS) and *Aeromonas hydrophila* infection. A group of 800 male Nile tilapia ($2.7 \text{ g} \pm 0.03$) was randomly distributed in 40 250-L aquaria (20 fish / tank) and fed eight practical diets OPF, OPF + Vit. C, OPF + Vit. E, OPF + Zn, Vit. C + Vit. E, Vit. C + Zn, Vit. E + Zn, OPF + Vit. C + Vit. E + Zn for 100 days. The diets were formulated to contain 30% crude protein and 18 MJ kg^{-1} crude energy. After feeding period, five fish per treatment were sampled for hematological profile, immunological parameters, antioxidant enzyme activity, Nrf2 gene expression and fillet lipid peroxidation. Then, three different groups of fish were subjected to different types of stress: one group was subjected to HDOIS (34°C) for two days, another group was subjected to TIS for four hours, and the other group was subjected to bacterial infection for 15 days. Hematological profile, antioxidant enzyme activity, Nrf2 gene expression and fillet lipid peroxidation were determined before and after all types of stress, along with the immunological parameters that was determined only for fish subjected to

bacterial infection. The fish subjected to HDOIS and transport, kept the hematological profile within the normal range for healthy Nile tilapia. After bacterial infection, the fish showed anemia but better immunological parameters. There was an increase in antioxidant enzymes activity from Nile tilapia in all the challenges. In conclusion, dietary supplementation of OPF + Vit. C + Vit. E + Zn had a synergistic effect by improving antioxidant enzymes activity, immunological parameters, decreasing lipid peroxidation and maintaining hematological parameters under stress conditions.

Keywords: bacterial challenge, hematological profile, hepatic antioxidant enzyme, oxidative stress, transport induced stress.

Highlights:

1. The synergism among OPF, Vit. C, Vit. E and Zn improved antioxidant capacity of Nile tilapia under stresses conditions.
2. The synergism among OPF, Vit. C, Vit. E and Zn decreased MDA of Nile tilapia after TIS.
3. *Aeromonas hydrophila* infection decreased Nrf2 gene expression of Nile tilapia.
4. BC impaired immune response and antioxidant capacity, and enhanced fillet lipid peroxidation of Nile tilapia

1. Introduction

The stress generated by aquaculture intensification might impair fish growth and affect the antioxidant and immune systems thus, leading to economic losses in aquaculture worldwide (Ashley, 2007; Oliva-Teles, 2012). To prevent and reduce animal deaths, it is important to provide diets that can minimize and prepare for stress in fish

farming. The aquafeed industry have been aiming the production of functional diets, using functional feedstuffs as well as additives that meet the animal requirements during challenges caused by fish intensive culture systems (Levy-López et al., 2020).

Functional feedstuff is a timely branch of aquaculture research, in which the use of orange peel fragment can be considered a nutritional strategy (Vicente et al., 2019; Salem et al., 2019; Hosseini et al., 2020). The processing of this agro-industrial residue, which including husks and seeds, generates 60 million tons of waste worldwide annually (USDA, 2019).

OPF is an interesting agroindustrial residue (Delgado and Fleuri, 2015), enriched with flavonoids that can modulate antioxidant enzyme activity, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, consequently mitigating oxidative stress and preventing oxidative damage in DNA, proteins and lipids (Lee et al., 2009; Giri et al., 2016; Lizárraga-Velázquez et al., 2019; Vicente et al., 2019). Moreover, flavonoids can also modulate immune response by increasing immune cells activity and also triggering proteins and receptors involved in signaling phagocytosis and microbial destruction (Acar et al., 2015; Magrone et al., 2016; Giri et al., 2016; Hoseinifar et al., 2020).

In addition to flavonoids, the mineral and vitamin premix included in aquatic feeds generally meet fish requirements notwithstanding the fact that these nutrients could also be provided by the ingredients (Kiron, 2012). Zinc is a trace element that can directly affect leucocytes activity, enhance macrophages chemotaxis, and improve disease resistance. Moreover, this mineral is also a cofactor of superoxide dismutase enzyme (Hardy, 2001). Vitamins, on the other hand, will eliminate reactive oxygen species (ROS) directly, with emphasis on vitamins E and C, which have greater oxidative and reducing potential, respectively, therefore preventing lipid peroxidation and acting against

oxidation when in synergism (Combs Jr, 2008). As to the related-antioxidants nutrients, vitamin C supports the redox recycling of α -tocopherol which is involved in the reduction of free radicals, thus protecting against the potentially deleterious reactions of these reactive oxidizing species (Combs Jr, 2008). Therefore, all these compounds establish the antioxidant capacity of citrus fruits, mainly oranges (Amitava and Kimberly, 2014).

Recent approaches on different stress conditions in fish production revealed that vitamins, minerals and bioactive compounds are a valuable nutritional strategy to minimize stress consequences. Therefore, considering the importance of OPF for aquafeed industry, this study aimed to evaluate the synergism of OPF, vitamin C and E and zinc on growth performance, hematological profile, immunological parameters, antioxidant enzyme activities, Nrf2 gene expression and fillet lipid peroxidation.

2. Material and Methods

This research comprised two phases. In Phase I (100 days) fish were fed experimental diets supplemented with OPF, vit C, vit E and Zn aiming a better nutritional status for them to cope with stress. In Phase II, fish were subjected to three different stress conditions: transport, heat dissolved oxygen-induced stress and bacterial challenge. Hematological profile, antioxidant enzyme activity and immunological parameters were evaluated. The values obtained before and after stress were compared to better understand the possible synergistic effect of OPF, mineral and vitamins.

2.1. Experimental diets (Phases I and II)

Eight practical diets were prepared with orange peel fragment (OPF), vitamin C

(Vit. C), vitamin E (Vit. E) and zinc (Zn) supplementation:

OPF (0.6% OPF);

OPF + Vit. C (0.6% OPF + 600 mg kg⁻¹ Vit. C);

OPF + Vit. E (0.6% OPF + 200 mg kg⁻¹ Vit. E);

OPF + Zn (0.6% OPF + 79.51 mg kg⁻¹ Zn);

Vit. C + Vit. E (600 mg kg⁻¹ Vit. C + 200 mg kg⁻¹ Vit. E);

Vit. C + Zn (600 mg kg⁻¹ Vit. C + 79.51 mg kg⁻¹ Zn);

Vit. E + Zn (200 mg kg⁻¹ Vit. E + 79.51 mg kg⁻¹ Zn);

OPF + Vit. C + Vit. E + Zn (0.6% OPF + 600 mg kg⁻¹ Vit. C + 200 mg kg⁻¹ Vit. E + 79.51 mg kg⁻¹ Zn).

The dietary supplementation levels were chosen according to literature: orange peel fragment (Vicente et al., 2019), vitamin C (Falcon et al., 2007), vitamin E (Lim et al., 2009) and zinc (Sá et al., 2004). These diets were formulated to contain 30% crude protein and 18 MJ kg⁻¹ crude energy (NRC, 2011). The mineral and vitamin premix did not contain zinc, vitamin C and E. The orange peel fragment of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) osbeck) was obtained from JBTech Food[®] (Araraquara, SP, Brazil). At our laboratory, it was dried in a forced air oven, ground, and stored at -20°C until further use. Diets were mechanically mixed with water (23% of dry weight) in a KitchenAid multi-functional mixer (Ação Científica[®], Piracicaba, SP, Brazil) and extruded in a single-crew laboratory extruder (Esteec, Ribeirão Preto, SP, Brazil). After, the diets were oven dried overnight and stored at 5°C until further use.

2.2. DPPH and FRAP in OPF and diets

The superoxide radical scavenge activity of OPF and diets was determined as

described by Brand-Williams et al. (1995) and modified by Rossetto et al. (2009). Briefly, dried sample (500 mg) was weighted into light-protected centrifuge, extracted with ethanol and mixed with 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 equivalence. The ferric reducing power (FRAP) was determined according to Benzie and Strain (1996) measured at 594 nm.

2.3. Determination of total phenols (TP), total flavonoids (TF) in OPF and diets

The TP content was determined according to Singleton and Rossi (1965). Extracts were prepared using acidified methanol solution. Folin-Ciocalteu reagent and 20% sodium carbonate were added to the mixture. The results were calculated with gallic acid calibration curve and absorbance was measured at 725 nm. For TF analysis, the extracts were prepared according to the method described by Santos et al. (1998), slightly altered. The extraction was performed through an acidified methanol solution and later, by adding a 5% aluminum chloride solution. Absorbance was measured at 425 nm (Spectrophotometer BEL Photonics[®], SP 2000 UV/vis). The total flavonoids content was calculated by means of quercetin standard curve and the results presented as mg 100 g⁻¹ quercetin equivalent of dried mass.

2.4. Feeding trial (Phase I)

A group of 800 male Nile tilapia fingerlings was obtained from a commercial fish farm (Palmital, SP, Brazil) and transferred to AquaNutri Laboratory facilities (FMVZ, Botucatu, SP, Brazil). During the adaptation period (30 days) fish were fed practical diet

(control), as presented in Vicente et al. (2019).

Fish were then randomly sampled (2.7 ± 0.03 g, mean \pm SD), stocked in 40 250 L aquaria (20 fish/tank) and fed for 100 days. Each aquarium was considered an experimental unit (n=5). Fish were hand-fed four times a day. At each feeding, fish were fed three-four times until apparent satiation. The recirculated system was supplied with 12h light:12 h dark photoperiod, and water quality parameters were recorded once a week using an YSU 556[®] multi-probe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA). Water temperature was heater-controlled and kept at 26 ± 0.5 °C, the dissolved oxygen level was 6.7 ± 0.25 mg L⁻¹ and the pH was 6.2 ± 0.23 .

After 100-day feeding trial, the growth performance 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 body weight – initial body weight (g/fish)

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

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

Specific growth rate (SGR) = (Ln of final weight – Ln of initial weight) x 100 /
experimental period

Survival rate (SUR) = (initial fish number – final fish number) / initial fish number
x 100 (%)

2.5. Stress and analyses

After 100 days of feeding and before fish were weighted, six fish per treatment were anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹) to determine the hematological profile, antioxidant enzyme activity and fillet lipid peroxidation. All analyses were performed in the same

fish, and data obtained were considered before stress. Afterward, a different group of 160 fish were transferred to challenge room and subjected to HDOIS. After 48 hours the aforementioned analyses were performed, and data were considered after stress. Then, a third different group of 48 fish were subjected to TIS and after 4 hours the analyses were performed, and data were considered after stress. Lastly, another group of 48 fish was infected with *Aeromonas hydrophila* and, after 15 days the same analyses along with immunological parameters were performed. Data were considered after stress. For each stress, a comparison between before and after stress data were conducted in order to understand if fish were nutritionally prepared to cope with the induced-stress performed.

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

As to HDOIS, 160 fish (five/treatment) were transferred to the challenged room that contained 40 40 L-plastic aquaria with filter system, individual aeration, and a heating system to increase the water temperature. Tanks were divided into four sections with plastic net dividers to avoid agnostic interaction (Xavier et al., 2020). Therefore, a group of 160 fish were randomly distributed at a density of four fish per tank and subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress by the gradual increase of the water temperature, according to Teixeira et al. (2012), Damasceno et al. (2016) and Vicente et al. (2019). The temperature was set at 26°C and rises up 1°C h⁻¹ (80 watts aquarium heater) till reach 34°C. Then, fish stayed two days under this condition. At the same time the oxygenation dropped from 5.2 ± 0.2 to 1 ± 0.04 mg dL⁻¹. During the night, the oxygenation was reestablished, and the oxygen concentration returned to initial conditions (Lushchak et al., 2005). The temperature and dissolved oxygen concentration were monitored hourly using an YSI 556[®] multi-probe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA).

Fish were fed the same experimental diet as in feeding trial. At the end of HDOIS fish were anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹) to run the mentioned analyzes.

2.7. Transport induced-stress (Phase II)

TIS was performed as described by Barros et al. (2014). Briefly, 48 fish (six fish/treatment) were randomly assigned into eight 15-L net cages distributed in a 400 L fish transport tank and the transport simulation was undertaken for four hours. Every hour, the temperature and dissolved oxygen concentration were monitored using the YSI 556[®] multi-probe system and ammonia concentration was determined using a commercial kit (Alcon[®], Camboriú, SC, Brazil). After 4-hours under transport, fish were anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹) to run the mentioned analyzes.

2.8. Bacterial challenge (Phase II)

As to the bacterial challenge, *A. hydrophila* was isolated and grown in brain heart infusion (BHI) at 25°C for 18 hours. The concentration was obtained in a previous LD₅₀ trial. In sum, seven groups of 16 fish were infected with *A. hydrophila* (10²; 10³; 10⁴; 10⁵; 10⁶; 10⁷ and 10⁸ UFC ml⁻¹), while another group of 16 fish was injected with 0.9% saline solution as a negative control and mortality was recorded for 15 days. The LD₅₀ was calculated according to Plumb and Browser (1983). After LD₅₀, 48 fish (six/treatment) were challenged by intraperitoneal (IP) injection with 100 µl of *A. hydrophila* solution (10⁴) and randomly distributed into 40 40-L aquaria in an independent system. The mortality was recorded for 15 days, and then fish were anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹) to run the mentioned analyzes.

2.9. Hematological assay (Phases I and II)

After fish were randomly collected and anesthetized (benzocaine, 0.1 g L⁻¹), blood was withdrawn 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), hematocrit (Htc) and hemoglobin (Hb). The RBC was determined by dilution and enumeration using hemocytometer. The Htc was determined by microhematocrit method, as described by Goldenfarb et al. (1971). The Hb was determined by the cyanmethaemoglobin colorimetric method using a commercial kit (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, Brazil) according to Collier (1944). 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).

2.10. Immunological assay (Phases I and II)

Leukocytes were isolated from head and trunk-kidney as described by Secombes (1990). Head and trunk-kidney tissues were stored in L-15 2% and homogenized with a glass Potter-Elvehjem tissue grinder. The homogenized tissues were filtered through a 100- μ m sterile nylon mesh, and the resulting cell suspension was centrifuged and washed with cold, sterile phosphate buffer saline. The isolated cells were layered on a Percoll gradient and centrifuged at 400 \times g for 30 minutes. The cell layer at the interface was collected and washed two times with ice-cold phosphate buffer saline at 200 \times g for 10 minutes. Leukocytes were enumerated using a hemocytometer, and viability assessed by

Trypan blue staining and only used when cell survivability was higher than 95%. The cell suspension was adjusted in L-15 with 0.1% fetal bovine serum and 1.0 ml of leukocyte suspension was added per well in a sterile flat bottom 24-well microplate. The microplates were incubated at 27°C for 2 hours to allow cell attachment.

After this incubation, the supernatant was collected for nitric oxide (NO) measurement. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was measured in the cell monolayer, with the majority of the cells being monocytes. The nitric oxide concentration in the supernatant was measured by the Griess reaction (Green et al. 1981). Different concentrations of NaNO₂ solution were used to prepare a standard curve. Readings were measured by a spectrophotometer (Spectrophotometer Thermoscientific[®], Evolution 60S UV/vis) at 540 nm, and values were expressed as $\mu\text{mol } 10^{-5}$ cells. The hydrogen peroxide concentration in cells was measured by the phenol red oxidation method (Pick and Mizel, 1980). Different concentrations of H₂O₂ solution were used to prepare the standard curve. Readings were measured with a spectrophotometer (Spectrophotometer Thermoscientific[®], Evolution 60S UV/vis) at 620 nm, and values were expressed as nmol 10^{-5} cells. The intracellular production of superoxide anion was estimated by the formation of formazan granules described by Secombes (1990). Readings were measured with a spectrophotometer (Spectrophotometer Thermoscientific[®], Evolution 60S UV/vis) at 620 nm.

2.11. Antioxidant Enzyme Activity (Phases I and II)

Liver samples were obtained from the same fish that were bled for the hematological profile determination, before and after stress. Fish were killed by a lethal dose of benzocaine (1 g L⁻¹), liver samples were collected, immediately immersed in liquid

nitrogen and stored at -80°C until enzyme activity determination. Briefly, one gram of liver samples was homogenized in 5 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at 4°C . Supernatant was used for enzyme activity and total protein content analyzes.

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assayed according to Beauchamp and Fridovich (1971), which measured 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 H_2O_2 when heated, forming perchromic acid as an unstable intermediate. The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 570 nm. Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed according Flohé and Günzler (1984). The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 420 nm. For all antioxidant enzymes assay the total protein concentration was determined by Bradford (1976) method with Coomassie brilliant blue G-250, using bovine serum albumin as a standard.

2.12. Fillet lipid peroxidation (Phases I and II)

Five fish per treatment, before and 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 filtrated, and 5 ml of the extracts 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 ice water bath for 10 min.

The measurement of the 2-thiobarbituric acid reactive substances at 532 nm. The values were expressed as mg malonaldehyde/kg⁻¹ (MDA).

2.13. Real time quantitative PCR (Phases I and II)

Liver samples were obtained from the same fish that were bled for the hematological profile determination, before and after stresses. Fish were killed by a lethal dose of benzocaine (1 g L⁻¹), liver samples were collected, immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until Nrf2 expression determination. Total RNA was extracted using 500 µL of TRIzol[®] Reagent for each sample to disrupt cells and release their contents. The extraction product was quantified by NanoDrop Instrument (ND-1000 Spectrophotometer). Samples were treated with DNase, and a cDNA synthesis reaction was performed using a mixture containing 0.75 mM of oligodT solution, 0.15 mM of random oligonucleotides, 0.75 mM of dNTP, and 11 µL of RNA treated with DNase from the previous step. The samples were then incubated at 65 °C for 5 min and placed on ice for 1 min. To set the final solution, 0.50 mM of DTT, 40 U of RNase and 100 U of Super Script III were added. The reaction was then incubated at 50 °C for 1 hour and subsequently at 70 °C for 15 min.

β-actin expression was used as a reference gene for data normalization. Reactions were performed in a triplicate on a Real Time ABI 7300 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR green PCR Master Mix Kit under the following conditions. One cycle at 50 °C for 2 min, another cycle at 94 °C for 10 min, then 40 cycles at 94 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The obtained dissociation curve was as follows: 95 °C, for 15 s, 60 °C for 30 s, and 95 °C for 15 s. To calculate the efficiency of the oligonucleotides used, four dilutions of cDNA samples were made 1:5, 1:25, 1:125 and

1:625 (Pfaffl, 2001).

2.14. Statistical analysis

Prior to statistical analysis, dataset were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Barlett's test). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test to determine significant differences among treatments. All analyses were conducted using the Minitab® 18.1.1.0 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 when the data presented non-parametric behavior.

2.15. Ethics statement

All experiment procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University (protocol 0033/2018 - CEUA).

3. Results

3.1. Growth performance

There was no difference ($P > .05$) for final body weight, weight gain, feed intake, feed conversion rate, specific growth rate and survival rate (Table 02).

3.2. Hematological parameters before and after challenges

There was no difference among treatments either before or after HDOIS, TIS and bacterial challenge ($P > .05$). By the comparing the hematological parameters before and after stress, it can be observed that HDOIS determined a decrease on RBC ($P < .05$) for fish fed OPF + Vit. E and Vit. E + Zn. It was also observed a decrease on Hb ($P < .05$) for fish fed OPF and OPF + Vit. C + Vit. E + Zn. However, fish fed OPF showed an increase on MCV ($P < .05$), after HDOIS (Table 03).

By the comparison of data from each treatment, before and after transport induced-stress, RBC and MCHC increased ($P < .05$) for fish fed Vit. C + Zn and Vit. E + Zn, after stress (Table 04). When comparing the data from each treatment, before and after stress, bacterial challenge determined a decrease on RBC ($P < .05$) for fish fed all experimental diets. It was also observed a decrease on Hb ($P < .05$) for fish fed OPF, OPF + Vit. C and Vit. C + Zn. The bacterial challenge determined a decrease on Htc ($P > .05$) for fish fed all experimental diets, but OPF + Vit. C + Vit. E + Zn (Table 05).

3.3. Immunological parameters

There was no difference ($P > .05$) for nitric oxide, hydrogen peroxide and superoxide anion among treatments before bacterial challenge. By the comparison of data from each treatment, before and after *Aeromonas hydrophila* infection, fish fed OPF showed the highest H_2O_2 values and OPF + Vit. E, OPF + Zn and Vit. E + Zn the lowest ($P < .05$). Fish fed OPF, OPF + Vit. C and OPF + Vit. E showed an increase on NO ($P < .05$), and fish fed OPF, Vit. C + Zn and Vit. E + Zn showed a decrease on O_2^- ($P < .05$)

(Table 06).

3.4. Liver antioxidant enzymes activity

As to HDOIS no difference was observed ($P > .05$) for SOD activity among treatments before such stress. However, after stress, the comparison among treatments showed the highest activity ($P > .05$) for fish fed OPF + Vit. C + Vit. E + Zn and the lowest ($P > .05$) for fish fed OPF + Vit. E. As to CAT, differences was observed ($P > .05$) among treatments before stress, and fish fed OPF + Vit. C showed the highest enzyme activity and OPF + Zn, Vit. C + Vit. E and OPF + Vit. C + Vit. E + Zn the lowest. Related to the data obtained after stress, there was a difference ($P > .05$) among treatments. Fish fed OPF + Vit. C showed the highest CAT activity and fish fed OPF + Vit. E, the lowest. As to GPx there was a difference ($P < .05$) among treatments before stress. Fish fed OPF + Vit. C + Vit. E + Zn showed the highest enzyme activity and OPF + Zn showed the lowest. Related to after HDOIS, the comparison among treatments showed that fish fed OPF + Vit. C + Vit. E + Zn presented the highest enzyme activity ($P < .05$) and fish fed OPF + Zn, the lowest ($P < .05$) (Table 07).

There was no difference ($P > .05$) among treatments for SOD, either before or after TIS. As to CAT, the comparison among treatments showed that fish fed OPF + Vit. C presented the highest activity and OPF + Zn and Vit. C + Vit E the lowest ($P < .05$) before stress. Afterwards, the highest CAT activity was determined for fish fed OPF + Vit C, and the lowest for fish fed Vit C + Zn. As to GPx, fish fed OPF + Vit. C + Vit. E and Zn showed the highest activity before TIS, and fish fed OPF + Zn, the lowest. By comparing each treatment before and after stress, it was observed that TIS caused a decrease on SOD and GPx activity for fish fed OPF + Vit. C + Vit. E and Zn (Table 08).

By comparing all treatments, no difference was observed ($P > .05$) for SOD either before or after bacterial infection. As to CAT and by the comparison of treatments before the infection, the highest activity was observed for fish fed OPF + Vit C and the lowest for fish fed Vit C + Vit E and OPF + Vit. C + Vit. E and Zn. After infection, the highest activity was observed when fish was fed OPF + Zn and the lowest for fish fed Vit. E + Zn ($P < .05$). As to GPx the comparison of each treatment before the bacterial challenge showed that the highest activity was observed for fish fed OPF + Vit. C + Vit. E and Zn, and the lowest for fish fed OPF + Zn. There were differences among treatment after bacterial infection. By the comparison of each treatment, before and after stress, *Aeromonas hydrophila* infection determined a decrease ($P < .05$) on SOD for fish fed OPF + Vit. C, OPF + Vit. E and Vit. C + Vit. E. A decrease ($P < .05$) on CAT for fish fed OPF + Vit. C and an increase ($P < .05$) for fish fed OPF + Zn, and as to GPx, a decrease ($P < .05$) for fish fed OPF + Vit. C and OPF + Vit. E (Table 09).

3.5. Fillet lipid peroxidation

There was no statistical difference for lipid peroxidation ($P > .05$) among treatments before all types of stress. By comparing lipid peroxidation, before and after stress, HDOIS determined a decrease on lipid peroxidation ($P < .05$) for fish fed Vit. C + Vit. E and OPF + Vit. C + Vit. E + Zn (Figure 1a).

When comparing all treatments after TIS, fish fed OPF showed the highest malondialdehyde liver concentration and Vit. C + Zn the lowest. When comparing the data from each treatment, before and after stress, TIS determined an increase on lipid peroxidation ($P < .05$) for fish fed OPF, along with a decrease ($P < .05$) for fish fed Vit. C + Vit. E, Vit. E + Zn and OPF + Vit. C + Vit. E + Zn (Figure 1b). As to *Aeromonas*

hydrophila challenge and by comparing malondialdehyde liver concentration before and after stress, it was observed that bacterial infection determined an increase on lipid peroxidation ($P < .05$) for fish fed OPF (Figure 1c).

3.6. Real time quantitative PCR

There was no statistical difference for Nrf2 expression among treatments, either before or after all types of stress. On the other hand, by comparing gene expression, before and after bacterial challenge, it could be observed a decrease on Nrf2 expression ($P < .05$) for fish fed OPF + Vit. C + Vit. E + Zn (Figure 2).

4. Discussion

O intuito deste estudo foi avaliar o provável sinergismo entre o OPF, resíduo proveniente da indústria de produção de suco de laranja, o qual possui ação antioxidante comprovada, com as vitaminas C e E, vitaminas com ação antioxidante e imunoestimuladora e o zinco, mineral constituinte da enzima antioxidante superóxido dismutase. De modo geral, os resultados demonstraram que houve sinergismo entre os nutrientes e que, esta ação coordenada melhorou a resposta imunológica e antioxidantes e, ainda, determinou menor peroxidação lipídica para a tilápia-do-Nilo submetida a diferentes estresses. Observou-se, ainda, como resultado deste efeito sinérgico, a manutenção do perfil hematológico nas diferentes condições de estresse. Entretanto, o desempenho produtivo não foi influenciado.

Embora o efeito principal esperado do resíduo e micronutrientes suplementados nas rações fosse nos sistemas antioxidante e imune, o desempenho produtivo poderia

sofrer ação indireta e, portanto, foi avaliado. A ausência de diferença estatística entre tratamentos pode ser explicada pela formulação das rações, uma vez que essas dietas mesmo sem a suplementação dos nutrientes estudados para atender a exigência de saúde dos peixes, atendiam a exigência para crescimento (NRC, 2011). Resultados semelhantes foram, anteriormente, descritos por Vicente et al. (2019) e Xavier et al. (2020).

Esperava-se aumento principalmente da taxa de hemoglobina, para os peixes que foram submetidos ao HDOIS, uma vez que, em condições de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, é necessário garantir a oxigenação tecidual (Boyd, 1996). O aumento da taxa de hemoglobina nessas condições de estresse térmico/hipóxia foi relatado por Teixeira et al. (2012), Damasceno et al. (2015) e Vicente et al. (2019). Entretanto, mesmo com algumas diferenças pontuais, houve a manutenção dos parâmetros sanguíneos dentro da faixa considerada adequada para tilápias híbridas, o que deve ser considerado relevante e pode-se inferir que esta manutenção se deva a ação antioxidante dos nutrientes, uma vez que o estresse térmico/hipóxia determina o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que podem favorecer a peroxidação lipídica das células. Isto ocorre devido ao aumento da metabolização do oxigênio para garantir a oxigenação tecidual.

O manejo de transporte pode ocasionar mudanças nos parâmetros de qualidade de água, principalmente o aumento da concentração de nitrito. Este composto age sobre os eritrócitos e resulta na formação de metahemoglobina, o que impossibilita o carreamento de oxigênio (Ciji et al., 2015). Além do que, o transporte pode ser considerado estresse acumulativo, uma vez que os peixes são submetidos a captura, adensamento e hipóxia anterior do transporte em si (Chagas et al., 2012; Barros, et al., 2014). No presente estudo, os animais apresentaram aumento dos parâmetros hematológicos quando submetidos ao estresse por transporte. Possivelmente, a suplementação de vitamina E e zinco, garantiu

maior proteção das células vermelhas, uma vez que a vitamina E se encontra na membrana fosfolipídica, e garante maior fluidez e estabilidade da membrana.

A infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* causou anemia hipocrômica microcítica, o que pode ser comprovado pela diminuição no número de células vermelhas, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina, independente da dieta que os peixes receberam. Essa condição pode ter ocorrido por ação da bactéria, a qual tem a capacidade de provocar hemorragias (Campbell and Ellis, 2007), pois produz hemolisina, toxina que causa hemólise de eritrócitos (Groff and Zinkl, 1999). Somado a isso, provavelmente a bactéria pode ter utilizado o ferro da hemoglobina para se proliferar, uma vez que o grupamento heme é composto por quatro anéis pirrólicos ligados ao ferro (Devlin, 1998).

Além das alterações no perfil hematológico, a infecção por *Aeromonas hydrophila*, induz a ativação da resposta imunológica inata dos peixes, sendo os macrófagos ativados para eliminar o patógeno existente, conseqüentemente há o aumento da produção de mediadores químicos, como no caso o NO e H₂O₂ (Janeway, 1999). A fagocitose é mecanismo importante para a destruição de agente patogênicos e eficaz na proteção contra doenças em peixes (Kiron, 2012). No presente estudo, houve sinergismo do resíduo de laranja com as vitaminas estudadas. Pois tanto, a hesperidina presente na laranja e a vitamina C e E atuam na produção de linfócitos T e na produção e ativação de macrófagos (Barros et al., 2014; Parhiz et al., 2015).

A maior produção de H₂O₂ nos peixes infectados e alimentados com a dieta controle, pode ser explicada possivelmente, devido a hesperidina presente no OPF ativar a regulação do gene Nrf2, uma vez que esse gene tem como uma das ações ativar as enzimas do sistema antioxidante e, assim, aumentar a produção de peróxido de hidrogênio (Parhiz et al., 2015). Já, menor produção de H₂O₂ era esperada nos peixes infectados que receberam dietas suplementadas com vitamina E. Esta vitamina tem como coenzima o α -

tocoferol, o qual tem a capacidade de sequestrar as espécies reativas ao oxigênio e assim, diminuir os danos oxidativos causados nas células. A diminuição na produção do radical ânion superóxido também nos peixes infectados também está associada a ação dos nutrientes suplementados na dieta. Esse fato demonstra a associação do sistema imunológico e antioxidante, uma vez que os macrófagos quando fazem fagocitose para eliminação do agente patogênico, acarreta no aumento de produção de radicais oxidativos (Kono et al., 1996), assim, se faz necessário que o sistema antioxidante também esteja ativo para eliminar esses compostos oxidativos e evitar o dano celular.

Esperava-se que a suplementação do fragmento de casca de laranja proporcionasse aumento da atividade enzimática, devido à presença de hesperidina, composto este que regula a expressão do gene Nrf2, o qual aumenta a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx (Parhiz et al., 2015), como anteriormente citado. Este resultado não corrobora com estudo de Vicente et al., (2019), no qual tilápias-do-Nilo submetidas ao HDOIS e arraçoadas com dietas suplementadas com 0.6% OPF apresentaram aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx. Embora não tenha ocorrido aumento da atividade do sistema antioxidante, os peixes desafiados, independente do desafio, mantiveram sua atividade enzimática quando comparados aos peixes não desafiados. Já, o sinergismo da laranja e vitamina E diminuiu a atividade SOD, CAT e GPx dos peixes submetidos aos desafios. Isto pode ter ocorrido devido a capacidade da vitamina E em sequestrar espécies reativas ao oxigênio e, assim, diminuir o substrato para ação das enzimas antioxidantes. Nos peixes, as enzimas antioxidante só são ativadas quando as reservas de compostos antioxidantes se esgotam, como por exemplo vitaminas (Halliwell and Gutteridge, 1999).

O aumento da atividade da CAT em peixes infectados já era esperado para os peixes que receberam dietas suplementadas com o zinco. A metabolização normal do oxigênio acarreta na produção de EROS e, quando os animais são submetidos a condições

estressoras, pode ocorrer aumento dessas espécies reativas como o radical O_2^- o qual é reduzido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase, que por sua vez é dependente de zinco. Devido esta redução, os níveis circulantes de peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido em duas moléculas de água e uma de oxigênio pela enzima catalase (Kappus and Sies, 1981; Halliwell and Gutteridge, 1999). Assim, pode-se observar que os peixes infectados que receberam dietas suplementadas com zinco, conseguiram eliminar com eficácia as EROs.

O aumento do estresse oxidativo, tem como resultado da lise celular a produção de malonaldeído (Stogner and Payne, 1992). A peroxidação lipídica nos filés das tilápias submetidas ao desafio de transporte pode ter sido minimizada pelo sinergismo ocorrido entre o OPF, Vit. C, Vit. E e Zn. Houve maior peroxidação lipídica nos peixes após desafio, que receberam dietas suplementadas apenas com OPF. Esperava-se aumento da peroxidação lipídica após os desafios, uma vez que a falta de oxigenação e mudanças nos parâmetros de qualidade de água, causam aumento do estresse oxidativo, pois os animais aumentam seu metabolismo em busca de garantir a oxigenação tecidual e na tentativa reestabelecer a homeostase. Dentre as EROs produzidas, o radical hidroxila, tem como ação se ligar aos ácidos graxos insaturados presentes na membrana celular e então iniciar o processo de peroxidação lipídica. A lipoperoxidação causa efeitos deletérios aos fosfolipídios de membrana, o que pode causar redução da fluidez de membrana e inativação de enzimas transmembrana e, assim, levar a lise celular. (Hermes-Lima, 2004; Halliwell and Guteridge, 2007). Entretanto a peroxidação lipídica foi menor, nos peixes que receberam as dietas que continham além do OPF, a Vit. C, Vit. E e Zn. Pois como na ativação do sistema antioxidante, possivelmente, esses micronutrientes agiram em sinergismo e garantiram melhor estabilidade a membrana e aumentaram o sequestro de radicais livres. Era esperado que os peixes infectados, apresentassem maior peroxidação

lipídica, devido ao aumento do processo de fagocitose das bactérias pelos macrófagos que ocasiona aumento de EROs (Verlhac Trichet, 2010), que por sua vez se ligam a parede fosfolipídica da membrana celular e, assim, podem causar lise celular (Hermes-Lima, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007). Como foi visto no presente trabalho a expressão do gene Nrf2 foi menor nos peixes que foram infectados com a bactéria, o que ressalta a severidade deste desafio.

Em conclusão, a suplementação dietética de OPF + Vit. C + Vit. E + Zn teve ação sinérgica e promoveu melhor atividade do sistema antioxidante, melhora nos parâmetros imunológicos, diminuição da peroxidação lipídica e manutenção dos parâmetros hematológicos sob condições estressoras. São necessárias mais pesquisas que estudem o menor tempo necessário de administração desta dieta para atender on níveis das exigências para saúde frente aos desafios impostos, uma vez que o uso destes nutrientes eleva o preço da dieta.

5. Acknowledgments

The authors thank the National Consul for Scientific and Technological Development (CNPq) for doctoral scholarship to Igor Simões Tiagua Vicente and São Paulo State Research Foundation – FAPESP (2018/19865-5) for the financial support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001

Table 1. Formulation and antioxidant capacity of the experimental diets

Ingredients (g.kg ⁻¹)	OPF	OPF + Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit. E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn	OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	
Soybean meal	591.6	592.4	592.4	592.4	592.7	592.7	592.7	592.7	
Corn	339.3	337.8	338.2	338.4	343	343.2	343.8	336.9	
Soybean oil	32	32	32	32	32	32	32	32	
DL-Methionine (98%)	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	
L-Threonine (98.5%)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
L-Thrioptophan (98%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
Dicalcium phosphate	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	
BHT ¹	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Salt	1	1	1	1	1	1	1	1	
Premix Vit/Min ²	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
Vitamin C ³	0.9	1.8	0.9	0.9	1.8	1.8	0.9	1.8	
Vitamin E ⁴	-	-	0.4	0.1	0.4	0.1	0.4	0.4	
Zinc ⁵	-	-	0.05349	0.2139	0.05349	0.2139	0.2139	0.2139	
Orange peel fragment ⁶	6	6	6	6	-	-	-	6	
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
Phenolic content and antioxidant analyses									
									OF
Total phenols (mg.g ⁻¹)	146.13	148.03	148.18	147.37	143.5	141.98	143.5	151.29	623.33
Total flavonoids (mg.g ⁻¹)	131.77	138.94	128.93	128.82	124.95	119.36	117.08	145.85	383.84
DPPH (µg/g Trolox)	4.01	3.96	3.66	3.21	3.15	3.70	5.49	6.12	124.85
FRAP (mmol Fe g ⁻¹)	4.12	4.34	4.48	4.36	4.46	4.60	4.63	4.86	29.81

¹Butil Hidroxitolueno- antioxidante. ²Premix Vitaminico e Mineral (kg por produto): vitamina A = 1,200,000 IU; vitamina D₃ = 200,000 IU; vitamina E = 12,000 mg; vitamina K₃ = 2,400 mg; vitamina B₁ = 4,800 mg; vitamina B₂ = 4,800 mg; vitamina B₆ = 4,000 mg; vitamina B₁₂ = 4,800 mg; ácido fólico = 1,200 mg; pantotenato de cálcio = 12,000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65,000 mg; ácido nicotínica = 24,000 mg; Mn = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg.

³Vitamina C - Rovimix® Stay - C[®] 35 - DSM. Nutritional Products, Switzerland. ⁵Zinco - Sulfato de zinco monoidratado com 37,4% de zinco. OPF - orange peel fragment..

Table 2. Initial body weight (IBW), final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FRC), specific growth rate (SGR) of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc for 100 days.

Diets	P value
-------	---------

	OPF	OPF+ Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit. E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn	OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	
IBW	2.74 ± 0.02	2.74 ± 0.04	2.75 ± 0.04	2.74 ± 0.03	2.73 ± 0.03	2.74 ± 0.04	2.73 ± 0.04	2.72 ± 0.02	0.976
FBW (g)	79.44 ± 8.91	82.83 ± 8.75	84.30 ± 9.03	83.65 ± 8.66	83.52 ± 1.8	82.44 ± 10.7	78.93 ± 4.6	84.7 ± 10.7	0.941
WG (g)	75.25 ± 8.9	79.1 ± 8.74	80.3 ± 9	80 ± 8.7	78.13 ± 2.52	77.74 ± 10.4	75.2 ± 4.54	80.56 ± 10.1	0.933
SGR (%)	3.73 ± 0.13	3.78 ± 0.13	3.8 ± 0.12	3.8 ± 0.12	3.8 ± 0.01	3.77 ± 0.15	3.73 ± 0.07	3.81 ± 0.14	0.958
FI (g)	105 ± 21.1	96.2 ± 20.6	109.3 ± 21.7	95.3 ± 4.75	107.3 ± 23	111.4 ± 34	95 ± 29	107 ± 28	0.903
FCR	1.4 ± 0.4	1.21 ± 0.2	1.37 ± 0.31	1.2 ± 0.11	1.4 ± 0.32	1.44 ± 0.47	1.26 ± 0.35	1.31 ± 0.23	0.866
SUR (%)	90.31 ± 13	92.7 ± 12.3	96.42 ± 7.81	94.13 ± 8.9	95.5 ± 5.3	88.1 ± 10.5	93.43 ± 7.1	95 ± 6.1	0.757

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) = (Ln of final weight – Ln of initial weight) × 100 / experimental period. Values are means ± SD of eight replicates. No significantly difference at $P > .05$ (Tukey Test).

OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit. C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit. E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C, 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

Table 3. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to HDOIS.

		Diets								
		OPF	OPF+ Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit. E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn	OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	P value
RBC (10 ⁶ mL ⁻¹)	Before	2.12 ± 0.21	2.11 ± 0.30	2.17 ± 0.02 A	2.05 ± 0.14	2.09 ± 0.19	2.01 ± 0.22	1.98 ± 0.06 A	1.88 ± 0.18	0.371

	After	1.7 ± 0.44	1.91 ± 0.19	1.78 ± 0.16 B	1.88 ± 0.21	1.88 ± 0.14	1.84 ± 0.01	1.81 ± 0.04 B	1.7 ± 0.19	0.658
P value		0.11	0.248	0.007	0.165	0.102	0.181	0.002	0.181	
Hb (g · dL ⁻¹)	Before	7.56 ± 0.36 A	7.84 ± 0.86	7.05 ± 0.82	7.18 ± 1.04	6.91 ± 0.95	7.12 ± 0.91	6.72 ± 0.47	7.16 ± 0.74 A	0.466
	After	5.88 ± 0.98 B	7.1 ± 0.8	6.71 ± 1.21	7.42 ± 1.29	7.05 ± 0.3	6.78 ± 0.71	7.06 ± 0.47	6.13 ± 0.25 B	0.148
P value		0.017	0.197	0.642	0.752	0.776	0.532	0.285	0.032	
Hct (%)	Before	33.1 ± 2.33	33.8 ± 1.64	32.4 ± 1.81	34.1 ± 2.41	32.7 ± 3.37	34.1 ± 2.77	32.9 ± 2.82	34.8 ± 3.58	0.836
	After	27.2 ± 4.76	33 ± 3.04	32.7 ± 2.56	34 ± 3.72	32.4 ± 1.2	31.2 ± 3.55	32.8 ± 1.32	30.6 ± 4.55	0.08
P value		0.055	0.623	0.837	0.961	0.86	0.193	0.946	0.149	
MCV (fL)	Before	156.26 ± 9.5 B	161.87 ± 18.83	162.2 ± 25.1	166.25 ± 12.2	156.57 ± 10.91	170.54 ± 12.46	167.23 ± 18.41	185.03 ± 11.46	0.135
	After	169.77 ± 4 A	173.5 ± 17.6	183.5 ± 11	180.9 ± 12.6	172.5 ± 13.9	172.1 ± 18.6	181.34 ± 7.13	179.3 ± 10	0.616
P value		0.035	0.346	0.141	0.105	0.083	0.884	0.171	0.431	
MCHC (%)	Before	22.92 ± 1.6	23.23 ± 2.53	21.72 ± 1.48	20.1 ± 2.04	21.62 ± 0.24	20.88 ± 2.02	20.5 ± 1.67	20.6 ± 0.88	0.129
	After	21.7 ± 1.8	21.5 ± 1.67	18.36 ± 5.16	21.72 ± 1.7	21.8 ± 1.13	21.81 ± 1.93	21.56 ± 1.22	21.77 ± 2.24	0.331
P value		0.338	0.249	0.234	0.558	0.768	0.482	0.293	0.327	

Values are means ± SD of five replicates. RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Htc, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before and after heat/dissolved oxygen-induced stress by a T test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C, 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

Table 4. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to TIS.

		Diets								
		OPF	OPF+ Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit. E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn	OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	P value
RBC (10 ⁶ mL ⁻¹)	Before	2.12 ± 0.21	2.11 ± 0.30	2.17 ± 0.02	2.05 ± 0.14	2.09 ± 0.19	2.01 ± 0.22	1.98 ± 0.06 B	1.88 ± 0.18	0.371
	After	2.11 ± 0.26	2 ± 0.21	2.1 ± 0.19	2.2 ± 0.10	2.2 ± 0.32	2.03 ± 0.14	2.19 ± 0.16 A	2.1 ± 0.41	0.861
P value		0.94	0.52	0.42	0.11	0.57	0.85	0.03	0.34	

Hb (g · dL ⁻¹)	Before	7.56 ± 0.36	7.84 ± 0.86	7.05 ± 0.82	7.18 ± 1.04	6.91 ± 0.95	7.12 ± 0.91	6.72 ± 0.47	7.16 ± 0.74	0.466
	After	7.34 ± 0.47	7.47 ± 0.56	7.65 ± 0.73	6.42 ± 1.08	7.43 ± 0.39	7.92 ± 0.7	7.31 ± 0.51	7.74 ± 1.16	0.135
P value		0.44	0.46	0.27	0.29	0.31	0.19	0.1	0.37	
Hct (%)	Before	33.1 ± 2.33	33.8 ± 1.64	32.4 ± 1.81	34.1 ± 2.41	32.7 ± 3.37	34.1 ± 2.77	32.9 ± 2.82	34.8 ± 3.58	0.836
	After	33.6 ± 1.14	34 ± 0.05	33.5 ± 0.93	31.6 ± 4.5	35.3 ± 1.8	33.4 ± 1.68	31.6 ± 2.6	34.4 ± 4.1	0.281
P value		0.68	0.19	0.28	0.31	0.18	0.65	0.47	0.87	
MCV (fL)	Before	156.26 ± 9.5	161.87 ± 18.83	162.2 ± 25.1	166.25 ± 12.2	156.57 ± 10.91	170.54 ± 12.46	167.23 ± 18.41	185.03 ± 11.46	0.135
	After	161 ± 21.6	171.7 ± 16.3	161 ± 14	157.4 ± 16	163 ± 17.4	165.5 ± 18.8	144.3 ± 10.2	167.1 ± 25.4	0.431
P value		0.68	0.41	0.93	0.35	0.51	0.63	0.051	0.21	
MCHC (%)	Before	22.92 ± 1.6	23.23 ± 2.53	21.72 ± 1.48	20.1 ± 2.04	21.62 ± 0.24	20.88 ± 2.02	20.5 ± 1.67 B	20.6 ± 0.88	0.129
	After	21.85 ± 0.87	21.88 ± 1.15	22.8 ± 1.62	20.46 ± 3.06	21.11 ± 1.7	23.5 ± 1.9	22.7 ± 0.21 A	22.46 ± 1.49	0.199
P value		0.26	0.33	0.31	0.75	0.54	0.09	0.04	0.052	

Values are means ± *SD* of five replicates. RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Htc, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before and after transport stress by a T test ($P < .05$) OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C, 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

Table 5. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to BC.

		Diets								P value
		OPF	OPF+ Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn	OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	
RBC (10 ⁶ mL ⁻¹)	Before	2.12 ± 0.21 A	2.11 ± 0.30 A	2.17 ± 0.02 A	2.05 ± 0.14 A	2.09 ± 0.19 A	2.01 ± 0.22 A	1.98 ± 0.06 A	1.88 ± 0.18 A	0.371
	After	1.61 ± 0.29 B	1.53 ± 0.13 B	1.51 ± 0.13 B	1.51 ± 0.05 B	1.56 ± 0.34 B	1.5 ± 0.3 B	1.64 ± 0.16 B	1.35 ± 0.04 B	0.845
P value		0.015	0.013	0.00	0.001	0.024	0.019	0.008	0.004	
Hb (g · dL ⁻¹)	Before	7.56 ± 0.36 A	7.84 ± 0.86 A	7.05 ± 0.82	7.18 ± 1.04	6.91 ± 0.95	7.12 ± 0.91 A	6.72 ± 0.47	7.16 ± 0.74	0.466
	After	5.95 ± 1.14 B	5.9 ± 0.93 B	5.93 ± 0.73	5.51 ± 1.26	5.62 ± 1.18	5.35 ± 0.89 B	6.15 ± 1.05	5.78 ± 0.75	0.938

P value		0.04	0.011	0.056	0.056	0.098	0.018	0.31	0.27	
Hct (%)	Before	33.1 ± 2.33 A	33.8 ± 1.64 A	32.4 ± 1.81 A	34.1 ± 2.41 A	32.7 ± 3.37 A	34.1 ± 2.77 A	32.9 ± 2.82 A	34.8 ± 3.58	0.836
	After	25.2 ± 5.01 B	26 ± 2.57 B	26.8 ± 2.02 B	26.4 ± 4.87 B	25.2 ± 3.44 B	26.7 ± 1.86 B	27.8 ± 2.17 B	26 ± 2.83	0.933
P value		0.024	0.001	0.002	0.025	0.01	0.003	0.015	0.075	
MCV (fL)	Before	156.26 ± 9.5	161.87 ± 18.83	162.2 ± 25.1	166.25 ± 12.2	156.57 ± 10.91	170.54 ± 12.46	167.23 ± 18.41	185.03 ± 11.46	0.135
	After	158.6 ± 31.9	166.2 ± 3.72	177.51 ± 3.44	164.6 ± 13.9	164.3 ± 16.3	181.8 ± 24	169.6 ± 10.5	192.3 ± 14	0.246
P value		0.884	0.641	0.247	0.846	0.412	0.39	0.808		
MCHC (%)	Before	22.92 ± 1.6	23.23 ± 2.53	21.72 ± 1.48	20.1 ± 2.04	21.62 ± 0.24	20.88 ± 2.02	20.5 ± 1.67	20.6 ± 0.88	0.129
	After	23.76 ± 2.72	22.6 ± 1.73	22.08 ± 1.49	20.73 ± 2	22.14 ± 2.33	20.01 ± 2.51	22 ± 2.35	22.22 ± 0.46	0.250
P value		0.58	0.661	0.716	0.84	0.652	0.562	0.284	0.051	

Values are means ± *SD* of five replicates. RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Htc, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before and after bacterial challenge by a T test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment kg^{-1} and 600 mg of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg^{-1} of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg^{-1} of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg^{-1} of vitamin C and 200 mg kg^{-1} of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg^{-1} of vitamin C and 79.51 mg kg^{-1} of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg^{-1} and 79.51 mg kg^{-1} of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg^{-1} of vitamin C, 200 mg kg^{-1} and 79.51 mg kg^{-1} .

Table 6. Immunological parameters of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and zinc subjected to BC.

		Diets							OPF + Vit. C + Vit. E + Zn	P value
		OPF	OPF+ Vit. C	OPF + Vit. E	OPF + Zn	Vit. C + Vit. E	Vit. C + Zn	Vit. E + Zn		
NO (μmol)	Before	1.54 ± 0.37 B	1.32 ± 0.27 B	1.32 ± 0.27 B	2.29 ± 0.27	2.47 ± 1.25	2.95 ± 0.49	1.88 ± 0.41	2.5 ± 0.18	0.15
	After	2.52 ± 0.36 A	2.66 ± 0.34 A	2.66 ± 0.34 A	2.88 ± 0.85	2.72 ± 1.09	2.71 ± 0.37	2.44 ± 0.11	2.24	0.87
P value		0.047	0.014	0.014	0.374	0.83	0.54	0.149	-	
H ₂ O ₂ (nmol)	Before	1.76 ± 0.53	1.72 ± 0.65	1.75 ± 0.99	1.95 ± 0.57	1.27 ± 0.12	1.88 ± 1.27	2.02 ± 0.43	1.42 ± 0.04	0.88
	After	2.49 ± 0.35 a	1.91 ± 0.18 ab	1.26 ± 0.00 b	1.25 ± 0.33 b	1.49 ± 0.76 ab	1.61 ± 0.31 ab	1.01 ± 0.13 b	1.38	0.005
P value		0.142	0.673	0.48	0.165	0.75	0.755	0.06	-	
O ₂ ⁻	Before	1.62 ± 0.14 A	1.83 ± 0.36	1.71 ± 0.36	1.88 ± 0.11	2.25 ± 0.00	2.06 ± 0.14 A	1.68 ± 0.23 A	1.8 ± 0.56	0.359

	After	1.17 ± 0.07 B	1.23 ± 0.08	1.25 ± 0.03	1.19 ± 0.28	1.39 ± 0.5	1.19 ± 0.15 B	1.07 ± 0.07 B	1.02	0.729
P value		0.017	0.094	0.16	0.06	0.246	0.006	0.049	-	

Values are means ± *SD* of six replicates. NO, nitric oxide; H₂O₂, hydrogen peroxide; O₂⁻, anion super oxide. Uppercase letters compare the immunological response of fish in the same treatment before and after bacterial challenge by a T test ($P < .05$). Lowercase compare diets among treatment buy Tukey test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C e 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

Table 7. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to HDOIS

		Diets								
		OPF	OPF+ Vit C	OPF + Vit E	OPF + Zn	Vit C + Vit E	Vit C + Zn	Vit E + Zn	OPF + Vit C + Vit E + Zn	P value
SOD (U.mgpt ⁻¹)	Before	28.15 ± 3.7	30.02 ± 3.9	32.63 ± 2.1 A	25.48 ± 5.98	30.25 ± 3.39	29.14 ± 5	30 ± 9.03 A	35.87 ± 2.45	0.094
	After	24.71 ± 3.4 abcd	26.64 ± 5.81 abc	16.83 ± 5.57 dB	21.25 ± 3.9 bcd	28.77 ± 14.3 ab	23.61 ± 4.6 abcd	18.12 ± 0.6 cdB	30.56 ± 6.36 a	0.039
P value		0.172	0.322	0.002	0.234	0.582	0.2	0.043	0.142	
CAT (U.mgpt ⁻¹)	Before	2.15 ± 0.6 ab	2.42 ± 0.81 a	1.86 ± 0.78 abc	1.03 ± 0.43 c	1 ± 1.21 c	1.41 ± 0.68 bc	1.66 ± 0.63 abc	1.26 ± 0.3 c	0.031
	After	2.01 ± 0.3 ab	2.23 ± 0.75 a	0.94 ± 0.08 b	1.57 ± 0.47 ab	1.93 ± 1.01 ab	1.9 ± 0.4 ab	1.45 ± 0.39 ab	1.27 ± 0.45 ab	0.028
P value		0.668	0.707	0.06	0.1	0.34	0.28	0.547	0.965	
GPx (U.mgpt ⁻¹)	Before	6.9 ± 1.21 ab	7.53 ± 0.86 ab	8.24 ± 0.5 abA	6.31 ± 1.23 b	7.16 ± 0.75 ab	6.57 ± 1.25 ab	6.87 ± 1.87 ab	8.87 ± 1.05 a	0.021
	After	6.71 ± 1.46 ab	7.7 ± 1.8 ab	4.58 ± 1.41 bB	5.63 ± 1.16 ab	7.95 ± 4.15 ab	6.59 ± 1.41 ab	4.62 ± 0.91 b	9.01 ± 1.82 a	0.012
P value		0.831	0.896	0.006	0.403	0.698	0.934	0.06	0.884	

Values are means ± *SD* of six replicates. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxide. Uppercase letters compare the immunological response of fish in the same treatment before

and after heat/dissolved oxygen-induced stress by a T test ($P < .05$). Lowercase compare diets among treatment by Tukey test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C e 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹

Table 8. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to TIS.

		Diets								
		OPF	OPF+ Vit C	OPF + Vit E	OPF + Zn	Vit C + Vit E	Vit C + Zn	Vit E + Zn	OPF + Vit C + Vit E + Zn	P value
SOD (U.mgpt ⁻¹)	Before	28.15 ± 3.7	30.02 ± 3.9	32.63 ± 2.1	25.48 ± 5.98	30.25 ± 3.39	29.14 ± 5	30 ± 9.03	35.87 ± 2.45 A	0.094
	After	29.48 ± 6.32	25.65 ± 3.66	27.38 ± 8.77	27.69 ± 4.82	29.20 ± 5.37	32 ± 0.53	20.01 ± 8.74	26.53 ± 1.76 B	0.816
P value		0.698	0.11	0.263	0.54	0.724	0.273	0.734	0.00	
CAT (U.mgpt ⁻¹)	Before	2.15 ± 0.6 ab	2.42 ± 0.81 a	1.86 ± 0.78 abc	1.03 ± 0.43 c	1 ± 1.21 c	1.41 ± 0.68 bc	1.66 ± 0.63 abc	1.26 ± 0.3 c	0.031
	After	1.31 ± 0.65 b	3.12 ± 1.07 a	1.97 ± 0.55 ab	2.13 ± 0.91 ab	2.12 ± 0.25 ab	1.14 ± 0.86 b	1.51 ± 0.36 ab	1.57 ± 0.71 ab	0.012
P value		0.072	0.333	0.807	0.06	0.254	0.622	0.785	0.4	
GPx (U.mgpt ⁻¹)	Before	6.9 ± 1.21 ab	7.53 ± 0.86 ab	8.24 ± 0.5 ab	6.31 ± 1.23 b	7.16 ± 0.75 ab	6.57 ± 1.25 ab	6.87 ± 1.87 ab	8.87 ± 1.05 aA	0.021
	After	7.96 ± 2.17	6.67 ± 1.05	7.36 ± 2.57	6.98 ± 1.18	7.51 ± 1.86	8.01 ± 0.73	7.36 ± 2.46	6.59 ± 0.35 B	0.847
P value		0.378	0.182	0.492	0.413	0.713	0.068	0.738	0.01	

Values are means ± SD of six replicates. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase. Uppercase letters compare the immunological response of fish in the same treatment before and after transport induced stress by a T test ($P < .05$). Lowercase compare diets among treatment by Tukey test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C e 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

Table 9. Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diets containing orange peel fragment, vitamin C, E and Zinc subjected to bacterial challenge.

		Diets								P value
		OPF	OPF+ Vit C	OPF + Vit E	OPF + Zn	Vit C + Vit E	Vit C + Zn	Vit E + Zn	OPF + Vit C + Vit E + Zn	
SOD (U.mgpt ⁻¹)	Before	28.15 ± 3.7	30.02 ± 3.9 A	32.63 ± 2.1 A	25.48 ± 5.98	30.25 ± 3.39 A	29.14 ± 5	30 ± 9.03	35.87 ± 2.45	0.094
	After	22.8 ± 0.92	16.46 ± 5.87 B	18.76 ± 5.94 B	27.04 ± 3.04	19.24 ± 6.77 B	23.15 ± 3.63	25.14 ± 9.06	31.2 ± 2.1	0.116
P value		0.168	0.005	0.008	0.625	0.023	0.067	0.424	0.8	
CAT (U.mgpt ⁻¹)	Before	2.15 ± 0.6 ab	2.42 ± 0.81 aA	1.86 ± 0.78 abc	1.03 ± 0.43 cB	1 ± 1.21 c	1.41 ± 0.68 bc	1.66 ± 0.63 abc	1.26 ± 0.3 c	0.031
	After	1.4 ± 0.5 abcde	1.07 ± 0.27 cdeB	1.12 ± 0.53 de	2.43 ± 0.47 aA	1.52 ± 0.5 abcde	1 ± 0.15 bcde	0.9 ± 0.38 e	2.46 ± 1.84 abcd	0.001
P value		0.07	0.024	0.129	0.002	0.548	0.324	0.06	0.527	
GPx (U.mgpt ⁻¹)	Before	6.9 ± 1.21 ab	7.53 ± 0.86 abA	8.24 ± 0.5 abA	6.31 ± 1.23 b	7.16 ± 0.75 ab	6.57 ± 1.25 ab	6.87 ± 1.87 ab	8.87 ± 1.05 a	0.021
	After	4.98 ± 1.8	4.7 ± 1.82 B	5.15 ± 1.8 B	7.23 ± 0.9	5.12 ± 1.65	6.29 ± 1.01	6.97 ± 2.61	7.51 ± 4.86	0.228
P value		0.096	0.024	0.021	0.22	0.054	0.709	0.95	0.762	

Values are means ± *SD* of six replicates. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase. Uppercase letters compare the immunological response of fish in the same treatment before and after bacterial challenge by a T test ($P < .05$). Lowercase compare diets among treatment by Tukey test ($P < .05$). OPF: control 0.6% supplementation of orange peel fragment; OPF + Vit C.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C; OPF + Vit E.: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; OPF + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. C + Vit. E: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 200 mg kg⁻¹ of vitamin E; Vit. C + Zn: supplementation of 600 mg kg⁻¹ of vitamin C and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; Vit. E + Zn: supplementation of 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹ of zinc; OPF + Vit. C + Vit. E + Zn: 0.6% supplementation of orange peel fragment and 600 mg kg⁻¹ of vitamin C e 200 mg kg⁻¹ and 79.51 mg kg⁻¹.

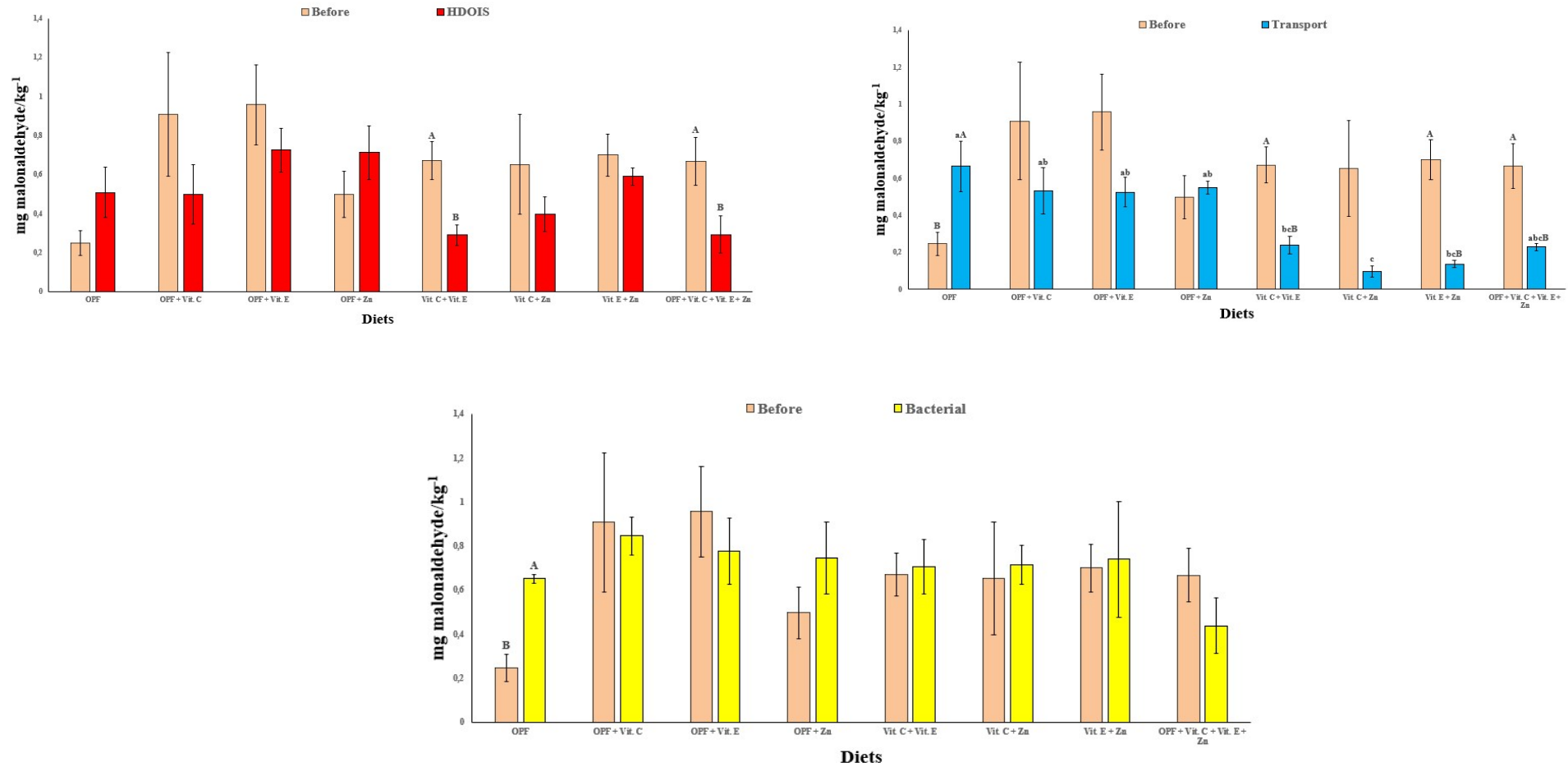


Figure 01 - Fillet lipid peroxidation of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress (HDOIS, 1a), transport-induced stress (TIS, 1b) and bacterial challenge (1c).

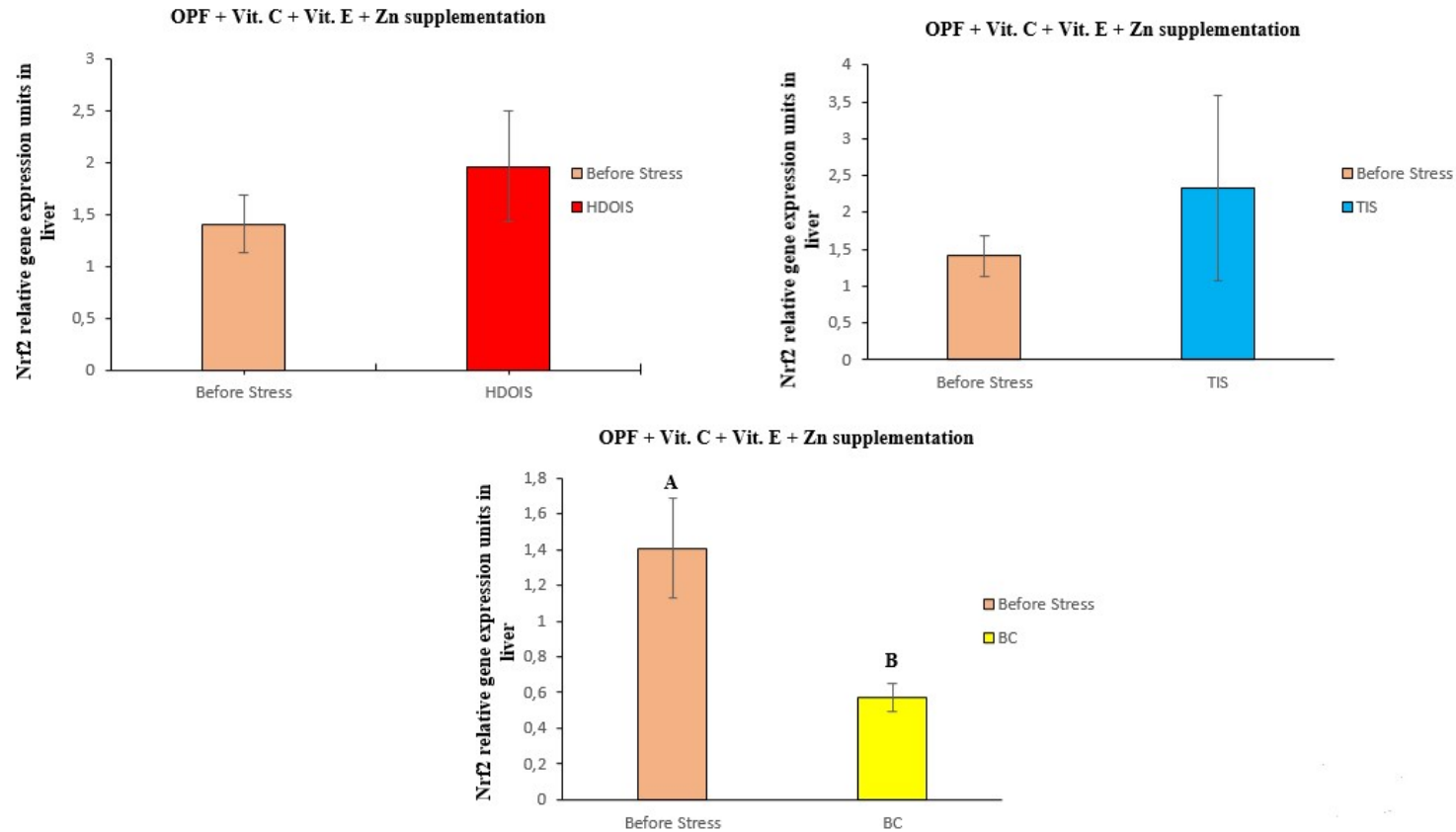


Figure 2. Effects of OPF + Vit. C + Vit. E + Zn on Nrf2 gene expression in Nile tilapia under heat dissolved oxygen-induced stress, transport and bacterial challenge.

6. References

- Acar, Ü. et al. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*. 437, 282–286. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.015
- Amitava D., Kimberly, K. 2014. Chapter 15 – Antioxidant vitamins and minerals. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*, p. 277–294.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 199–235. DOI: 10.1016/j.applanim.2006.09.001.
- Barros, M.M., et al. 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed beta-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol*, 39(2), 188-195. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.05.004
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assay and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
- 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.*, 39(1), 70-76.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
- Brand-Williams, W., et al. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Boyd, C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. *Shrimp Mart*, Songkhla, Thailand
- Campbell, T., Ellis, C. 2007. *Avian and exotic animal hematology and cytology*. New York: Wiley-Blackwell.

- Chagas, E.C. et al. 2012. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com β -glucano. *Biotemas*, 25(4) 221-227. DOI: 10.5007/2175-7925.2012v25n4p221
- Ciji, A. et al. 2015. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. *Aquac. Res.*, 46(8), 2013-2014. DOI: 10.1111/are.12355
- Collier, H. B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.* 50(6), 550–552.
- Combs, G.F., Jr. 2008. Vitamin E, in *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition & Health*, pp. 179-203, Academic Press Inc., San Diego. CONTE, F. S. Stress and welfare of culture fish. *Applied Animal Behavior Science*, Oxford, v. 86, p.205, 2008.
- Damasceno, F. M. et al. 2016. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. *Aquaculture*, 454, 257– 264. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.029
- Delgado, C. H., Fleuri, L. F., 2015 Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description – A review. *Food Rev. Int.*, 32, 1-14. DOI: 10.1080/87559129.2015.1041183.
- Devlin, T. M. 1998. *Manual a bioquímica: com correlações clínicas*. Editora Blucher.
- Falcon, D. R. et al., 2007. Physiological responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C-and lipid-supplemented diets and submitted to low-temperature stress. *J. World Aquacult. Soc.*, 38(2), 287-295. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2007.00098.x
- Flohé, L., Günzler, W. A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 105, 114-120. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)05015-1
- Giri, S. S., et al. 2016. Dietary Administration of banana (*Musa acuminata*) peel flour affects the growth, antioxidant status, cytokine responses, and disease

susceptibility of rohu, *Labeo rohita*. J. Immunol. Res. DOI: 10.1155/2016/4086591

Goldenfarb, P. B. et al. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. Am. J. Clin. Pathol. 56(1), 35–39. DOI: 10.1093/ajcp/56.1.35

Green, L.C., et al. 1981. Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 7764-7768. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7764

Groff, J. M., Zinkl, J. G. 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish: Common carp and goldfish. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract., 2(3), 741-776.

Halliwell, B.; Gutteridge J. M. C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. New York: Oxford University Press. 936p.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2007 Free radicals in biology and medicine. 4 ed. New York: Oxford: Clarendon;

Hardy, R.W., 2001. Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset and identification. In: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), Nutrition and Fish Health. The Haworth Press, Inc., Binghamton, New York, p. 131–147.

Hermes-Lima, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Functional metabolism: Regulation and adaptation, v. 1, p. 319-66, 2004. DOI: 10.1002/047167558X.ch12

Hoseinifar, S. H.; et al. 2020. Humoral and skin mucosal immune parameters, intestinal immune related genes expression and antioxidant defense in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed olive (*Olea europea* L.) waste. Fish Shellfish Immunol. 2020, 100, 171–178. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.02.067

Hosseini, S. M. et al. 2020. The potential benefits of orange peels derived pectin on serum and skin mucus immune parameters, antioxidant defense and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish Shellfish Immunol., 103, 17-22. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.04.019

- Janeway, C. J., 1999. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*, 4^o ed. Editora Artes Médicas Sul Ltda, Porto Alegre
- Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim Feed Sci Tech.*, 173(1-2), 111-133. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015
- Kono, K. et al. 1996. Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 26(6), 1308-1313. DOI: 10.1002/eji.1830260620
- Kappus, H., Sies, H. 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233-1241.
- Lee, S. M. 2009. LDL oxidation, antioxidant capacity and growth of cultured grey mullet (*Mugil cephalus*) fed dietary sorghum distillery residue pretreated with polyethylene glycol. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7877–7882. DOI: 10.1021/jf901367u
- Leyva-López, N. et al. 2020. Exploitation of Agro-Industrial Waste as Potential Source of Bioactive Compounds for Aquaculture. *Foods* 9.7: 843. DOI: 10.3390/foods9070843
- Lim C., et al. 2009. Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge. *Aquaculture*, 298, 76-82. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.09.025
- Lizárraga-Velázquez, C. E. 2019. Effect of dietary intake of phenolic compounds from mango peel extract on growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47, 602–611. DOI: 10.3856
- Lushchak, V. I. et al. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J. Biochem. Cell Biol.*, v. 37, n. 6, p. 1319-1330. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.01.006

- Magrone, T. et al. 2016. Administration of a polyphenol-enriched feed to farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) modulates intestinal and spleen immune responses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* DOI: 10.1155/2016/2827567
- National Research Council, 2011. Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp National Academies Press, Washington, DC.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35 (2), 83–108. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x
- Parhiz, H, et al., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother. Res.*, 29(3), 323–331. DOI: 10.1002/ptr.5256
- Pick, E., Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods*, 38(1-2), 161-170. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90340-3
- Plumb, J.A.; Bowser, P.R. 1983. Microbial fish disease laboratory manual. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station.95p.
- Rossetto, M. R. M., et al. 2009. Antioxidant substances and pesticide in parts of beet organic and conventional manure. *African J. Plant Sci.* 3(11), 245–253.
- Sá, M. V. C., et al. 2004. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture*, 238(1-4), 385–401. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.011
- Salem, M. E. Set al. 2019. Effects of dietary orange peel on growth performance, antioxidant activity, intestinal microbiota and liver histology of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquac. Nutr.*, 25(5), 1087-1097. DOI: 10.1111/anu.12925
- Santos, M. D. D., et al. 1998. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Braz. J. Bot.*, 21(2), 135-140.
- Secombes, C.J. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing

- activity. In: Stolen, J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. Fair Haven: SOS Publications.137-154.
- 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(2), 389-394. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90132-7
- Stogner, S. W., Payne, D. K. 1992. Oxygen toxicity. *Ann. Pharmacothe.*, 26, 1554–1562. DOI: 10.1177/106002809202601214
- Teixeira, C. P., et al. 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. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02911.x
- United States Department of Agriculture 2019. *Citrus: World Markets and Trade*; Foreign Agricultural Service: Washington, DC, USA.
- Verlhac Trichet, V. 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquac. Res.*, 41(3), 356–372. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x
- Vicente, I. S. T. et al. 2019. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquac. Res.*, 50(1), 80-92. DOI: 10.1111/are.13870
- Vyncke, W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 72(12), 1084-1087. DOI: 10.1002/lipi.19700721218
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica* 51, 32-49
- Xavier, W. et al. 2020. The putative effect of a SOD-rich melon pulp-concentrate on growth performance and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) under heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquaculture* 529, 735669. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735669

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

A aquicultura está em crescente ascensão, sendo que no setor da cadeia produtiva a maior parte dos gastos está relacionada a compra de ração. Desta forma, se faz necessária a utilização de alimentos alternativos que contribuam para a diminuição dos gastos na produção de ração e favoreçam nutricionalmente, tanto o crescimento quanto a saúde dos peixes das mais diferentes espécies.

Atualmente, além da preocupação em diminuir os custos de produção, as indústrias de ração e os centros de pesquisas de nutrição e saúde animal, têm a visão sustentável de toda a cadeia produtiva. A utilização de resíduos agroindustriais como o fragmento de casca de laranja é alternativa interessante, já que é subproduto gerado da indústria de suco de laranja e, na maioria das vezes, é descartado no meio. Esta indústria gera em torno de 60 milhões de toneladas deste resíduo, o que denota a necessidade do destino adequado deste subproduto. Sendo assim, o fragmento de casca de laranja tem potencial para utilização nas rações para peixes de diferentes espécies, como visto nesta pesquisa.

A inclusão do fragmento de casca de laranja em dietas para tilápia-do-Nilo submetidas aos diferentes desafios, proporcionou manutenção e melhora dos parâmetros sanguíneos, imunológicos e na atividade das enzimas antioxidantes. A inclusão deste subproduto não afetou negativamente o crescimento das tilápias-do-Nilo. Também foi observado sinergismos entre o fragmento de casca de laranja e as vitaminas e mineral utilizados. Assim, este subproduto não interferiu na absorção de outros micronutrientes essenciais para os peixes.

Novas pesquisas que estudem os possíveis sinergismos com outros minerais, vitaminas e aminoácidos são necessárias. Nestes estudos futuros recomenda-se avaliar o

tempo de administração das dietas que foram suplementadas com o fragmento de casca de laranja em combinação com outros nutrientes. Além da utilização de outras metodologias de mensuração de estresse oxidativo, como a produção de espécies reativas ao oxigênio e mediadores da peroxidação lipídica.