

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

USO DO FRIT DE LARANJA EM DIETAS PARA TILÁPIA-DO-NILO: DESEMPENHO
PRODUTIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

IGOR SIMÕES TIAGUA VICENTE

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

MAIO – SP

2017

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

USO DO FRIT DE LARANJA EM DIETAS PARA TILÁPIA-DO-NILO: DESEMPENHO
PRODUTIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

IGOR SIMÕES TIAGUA VICENTE

Zootecnista

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Margarida M. Barros

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Luciana F. Fleuri

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
- UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

V632u Vicente, Igor Simões Tiagua, 1991-
 Uso do frit de laranja em dietas para tilápia-do-
 nilo: desempenho produtivo e sistema antioxidante / Igor
 Simões Tiagua Vicente. - Botucatu : [s.n.], 2017
 vi, 45 f.: il., tabs.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
 2017

 Orientador: Margarida M. Barros
 Coorientador: Luciana F. Fleuri
 Inclui bibliografia

 1. Antioxidantes. 2. Tilápia-do-Nilo. 3. Laranja. I.
 Barros, Margarida Maria. II. Fleuri, Luciana Francisco.
 III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
 Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Vete-
 rinária e Zootecnia. IV. Título.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e

Se tornar um autor da própria história. . . .

(Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Arivaldo Tiagua Vicente e Mary Ferreira Simões,

Por serem meus exemplos de força e perseverança.

À minha tia,

Marcia Ferreira Simões,

Por todo incentivo durante toda essa trajetória

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre acreditar em mim, me incentivar nos momentos difíceis, por se preocuparem sempre com a minha formação, e se esforçarem para que sempre eu estivesse nas melhores condições. **MEU MUITO OBRIGADO!!!!**

À minha orientadora, Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pelos ensinamentos, incentivo, paciência, preocupação tanto comigo para com minha família, por sempre acreditar na minha capacidade, puxões de orelha, mas sempre se preocupando com a minha formação.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri, 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 Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela contribuição e ajuda nas análises estatísticas;

À doutoranda Débora Prado, pela enorme ajuda nas análises experimentais, por todas as risadas, conversas, almoços!!! Muito Obrigado!!!

Aos meus amigos, Hinglidj de Carvalho Müller, Rafael Fogaça, Livia Carrasco, Daniele Santos de Souza, por me proporcionarem muitas risadas, confidências, que me incentivaram ir até o fim sempre e me fazer acreditar que posso fazer sempre o melhor. Muito obrigado por tudo!!!

Às minhas amigas em especial, Hinglidj de Carvalho Müller e Daniele Santos de Souza, pelos inúmeros puxões de orelha quando foi necessário, pelas constantes risadas, por sempre acreditarem que eu era capaz de concluir esse trabalho, pela imensa ajuda durante a fase experimental, durante as disciplinas, por serem mais que minhas amigas e sim irmãs!

Aos colegas do AquaNutri, Hinglidj de Carvalho Müller, Rafael Fogaça, Pedro Pucci, Pedro Ventura, Matheus Gardim, Catharina Mirable, Natália Brasil. Esse trabalho não aconteceria sem a ajuda de todos vocês.

Ao meu companheiro Cadu, por tudo que nós passamos durante esses 4 anos de namoro, pelo incentivo, companheirismo, por me fortalecer cada dia mais, por me acalmar nos momentos de desespero quando achei que nada iria dar certo. Meu Muito Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo: 2015/18072-3) e CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, pela minha formação;

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP, Botucatu, pela oportunidade da obtenção desse título de mestre;

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Melhoramento e Nutrição Animal e Produção Animal pelo auxílio e amizade;

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Laranja como Potencial Antioxidante	2
2. Hematologia em Peixes	4
3. Estresse em Peixes	6
4. Sistema Antioxidante	8
4.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)	10
4.2 Catalase (EC 1.11.1.6)	11
4.3 Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9)	11
5. Referências.....	13

CAPÍTULO II

Dietary orange frit on antioxidant capacity and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress

Abstract.....	21
1. Introduction.....	22
2. Material and Methods.....	23
3. Results.....	28
4. Discussion.....	29
5. Acknowledgments.....	32
6. References.....	33

TABELAS

Table 1 - Formulation and chemical composition of the experimental diets.....	38
---	----

Table 2 – Final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), survival (SUR) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit.....	39
Table 3 – Hematological parameters of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.....	40
Table 4 – Total plasma protein (TPP), albumin (Alb), globulin (Glob) and albumin:globulin ratio (A:G) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.....	41
Table 5 – Lymphocytes (Lynf), neutrophil (Neutr) and monocytes (Mon) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.....	42
Table 6 - Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.....	43
 CAPÍTULO III	
Implicações.....	45

CAPÍTULO I

1. Laranja como Potencial Antioxidante

De acordo com o MAPA (2016) 80% da produção brasileira de laranja e 50% da produção mundial são destinadas para as indústrias de suco industrializado. O principal comprador da bebida brasileira é a União Européia que aumenta, significativamente, o percentual de importação anual. A maior parte das importações mundiais, 85%, é absorvida por três mercados: Estados Unidos, União Européia e Canadá. Deste montante produzido 85% destinaram-se às indústrias processadoras de suco e 15% ao mercado in natura. O processamento das frutas para obtenção de sucos e polpas gera entre 30 a 40% de resíduos agroindustriais (MARTINS e FARIA, 2002).

A utilização eficaz dos resíduos gerados pelas indústrias de processamento é crescente, e o principal reflexo desse crescimento é o desenvolvimento de bioprocessos objetivando otimizar os substratos para produção de moléculas de alto valor, como ácidos orgânicos, proteínas microbianas, enzimas e etanol (PANDEY et al., 1999; VILLAS-BÔAS et al., 2002; ROSALES et al., 2005; REDDY, 2007). Pelo potencial produtivo da laranja, esta se encontra entre as frutas mais consumidas e produzidas no mundo, sendo que a produção pode ultrapassar 80 milhões de toneladas/ano. Devido às altas taxas produtivas, o uso dos bioprocessos no processamento dos resíduos pode ser alternativa economicamente viável, além de constituir ferramenta interessante para minimizar os impactos ambientais decorrentes do acúmulo desses resíduos industriais na natureza.

A extração do suco de laranja tem por objetivo separar o suco do restante do fruto. Dependendo do equipamento utilizado, os subprodutos são separados em diferentes frações. Entre os equipamentos mais utilizados estão os de extração da JBT Food Tech® que é considerado referência no desenvolvimento de equipamentos e tecnologia para o processamento de alimentos (VIDAL e VIDAL, 2006). O equipamento separa subprodutos em três frações, designados como casca, composta pela parte interna do epicarpo, núcleo, formado pelo endocarpo no qual encontram-se as sementes e as bagas e frit, que por sua vez é o fragmento de casca mais externo do epicarpo que no qual possui grande quantidade de glândulas oleaginosas. O equipamento comprime a laranja entre os copos; sendo a polpa e o suco retidos no tubo de filtro, enquanto que a casca e o frit são, separadamente, dispostos na parte superior, entre o copo e o cortador. Tanto o suco quanto a polpa no tubo de filtro são submetidos a pressão, devido ao movimento provocado pela entrada de mais material. As partículas maiores são descartadas e enviadas para a produção de granulados de polpa cítrica. Após a extração, o suco ainda detém celulose e resíduos nucleares que são removidos por

equipamentos denominados de acabamentos adicionais. Estes separam a polpa do suco por filtração (QUEIROZ e MENEZES, 2005).

A extração de suco de laranja é um processo mecânico. As fases de normalização são efetuadas apenas após a extração, e podem incluir a adição de compostos químicos e processos de preservação, tais como pasteurização que utiliza alta temperatura (VIDAL e VIDAL, 2006).

Anatomicamente, a laranja é um fruto hesperídeo, sincárpico, carnudo e indeiscente. Suas partes são: epicarpo, que consiste na parte colorida e externa do fruto; mesocarpo, composto pela parcela branca e localizado entre o epicarpo e endocarpo, composto por botões, no qual as sementes são inseridas (NASCIMENTO, 2008). Comparando-se as definições botânicas e industriais de componentes de frutas alaranjadas, a fração chamada casca consiste no epicarpo; a fração denominada fragmento de casca (frit) (Figura 1) corresponde à parte externa do epicarpo e o núcleo consiste no mesocarpo (DELGADO e FLEURI, 2015).

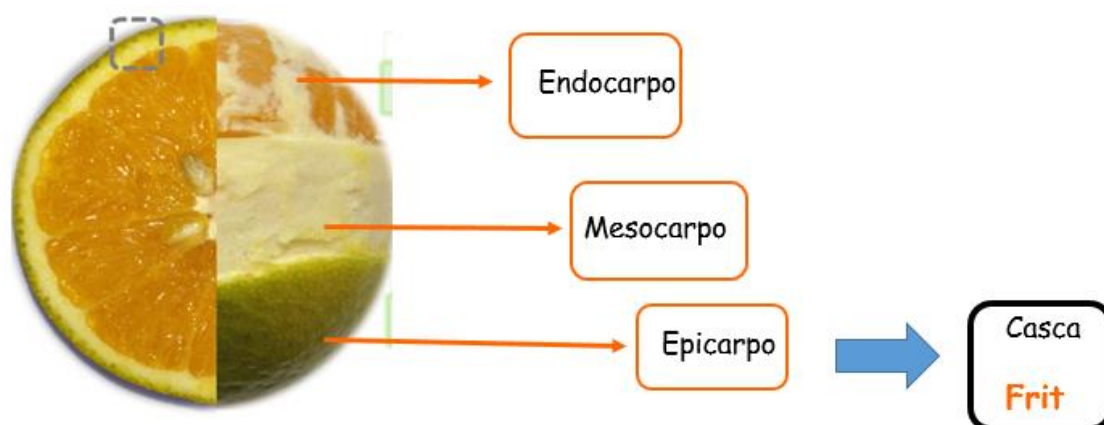


Figura 1 – Fragmento de casca (Frit)

Os resíduos produzidos dependem do tipo de fruta processada nas agroindústrias de sucos e polpas e tem como principais substratos, sementes, bagaço e cascas. Todos esses subprodutos possuem em sua composição minerais, fibras, vitaminas e compostos antioxidantes importantes para as funções fisiológicas (MATIAS et al., 2005).

Estudos recentes demonstram que a laranja é rica em compostos antioxidantes e nutrientes, encontrados em maior concentração nas sementes e cascas (COSTA et al., 2000; MELO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010). Os efeitos benéficos do consumo de frutas e hortaliças se associam à presença de substâncias antioxidantes como

vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos (VASCONCELOS et al., 2006; PIENIZ et al., 2009). Esses compostos apresentam propriedades de óxido-redução, os quais atuam na inibição e sequestro dos radicais livres (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Dentre as frutas, a laranja possui concentração elevada de compostos que atuam no sistema antioxidante, tais como ácido ascórbico e compostos fenólicos. Isso ocorre, pois os níveis de compostos fenólicos e ácido ascórbico correspondem a 76% do total dessa fruta (PELLEGRINI et al., 2007).

Estudos realizados por Jayaprakasha e Patil (2007) comprovaram que extratos de frutas cítricas demonstram compatibilidade nas propriedades antioxidantes naturais presentes nas frutas com os antioxidantes comerciais sintéticos. Esses autores destacaram ainda que, com alterações na composição de laranjas e tangerinas, podem ocorrer também alterações na capacidade antioxidante.

2. Hematologia em Peixes

O sangue, tecido líquido móvel e do tipo conjuntivo é composto por eritrócitos, leucócitos e trombócitos, plaquetas e plasma, que corresponde a matriz celular. Este, é composto em sua totalidade de 90% de água e 7% de proteínas, as quais englobam globulinas e albumina, responsáveis pela manutenção da pressão oncótica, ou seja, as proteínas geram pressão osmótica para atravessar as paredes dos capilares. É composto, ainda, por hormônios, enzimas e diferentes eletrólitos (RANZANI-PAIVA, 2007).

Fatores ambientais, biológicos e nutricionais podem influenciar a hematopoiese em peixes, o que acarreta alterações dos constituintes sanguíneos, porém para cada estímulo a que são submetidos ocorrem diferentes respostas hematológicas. Além desses fatores existe variação de acordo com a espécie, biologia e ecologia do animal (SERIANI e RANZANI-PAIVA, 2012).

Para estabelecer diagnósticos em peixes, o estudo dos componentes sanguíneos é ferramenta eficaz e pode acusar possíveis alterações geradas por deficiências nutricionais, acometimento por bactérias ou influência do ambiente (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; AZEVEDO et al., 2006;). Estudos demonstraram que a utilização do perfil hematológico reflete as respostas fisiológicas dos organismos de forma consistente. Entretanto, a utilização do sangue como instrumento de diagnóstico de doenças de peixes requer, inicialmente, o conhecimento

dos valores hematológicos normais considerando-se as características de cada espécie e do local onde vivem.

As células mais abundantes na circulação sanguínea são os eritrócitos, que são ovais com citoplasma eosinofílico não granular e núcleo oval. Tem como função o transporte de oxigênio e gás carbônico, por meio da hemoglobina que se encontra no interior das células vermelhas, que quando ligada ao oxigênio gera o complexo denominado oxihemoglobina e após oxigenação tecidual esse composto é quebrado e ocorre troca pelo gás carbônico tecidual (RANZANI-PAIVA, 2007). Por meio da determinação da porcentagem de eritrócitos em relação ao volume total de sangue é determinado o hematócrito. Também pelos eritrócitos são avaliados os índices hematimétricos como a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o volume corpuscular médio (VCM), parâmetros esses relacionados ao tamanho dos eritrócitos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Sabe-se que em espécies mais ativas, ocorre aumento proporcional na taxa de hemoglobina e no número de eritrócitos, entretanto ocorre redução no volume das células (LAY e BALDWIN, 1999). Segundo Rambhaskar e Srinivasa-Rao (1987), esse aumento na demanda por eritrócitos nos peixes de maior atividade metabólica existe devido à necessidade desses animais por maior quantidade de oxigênio para suprir o metabolismo.

O aumento da liberação de catecolaminas nas diferentes fases do estresse pode resultar num aumento do número de eritrócitos e no valor do hematócrito, assim como nas taxas de hemoglobina, pois a ação exacerbada desse hormônio reflete na captação do oxigênio, que resulta na alteração da capacidade de transporte e difusão do oxigênio pelo sangue (BARCELLOS et al., 2004; URBINATI e CARNEIRO, 2004; BENDHACK, 2008; FALCON et al., 2008; BARROS et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2012).

Responsáveis pela defesa do organismo, os leucócitos, utilizam a via sanguínea para realizar o combate às infecções. São caracterizados de acordo com sua função de defesa no organismo, morfologicamente diferenciados pela presença ou ausência de grânulos no seu interior e por sua ação citoquímica (SATAKE et al., 2009). Os leucócitos granulares são representados pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, já os agranulares, pelos monócitos e linfócitos. Segundo Lehmann et al. (1987), os neutrófilos dos peixes são células com papel importante de defesa, com ação fagocítica e, devido aos grânulos de glicogênio presentes no citoplasma, estão associados ao fornecimento de energia para realização da fagocitose.

Por sua vez, os monócitos são dotados de poucos pseudópodes, alta quantidade de mitocôndrias, vacúolos e complexo de Golgi. Quando ocorre infecção, esse tipo celular se desloca de dentro dos vasos sanguíneos periféricos para o foco inflamatório e recebe o nome de macrófago. Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), os trombócitos possuem função de hemostasia e participam do mecanismo de defesa, com participação no processo de coagulação e inflamação, assim como atividade fagocítica nos processos de infecção.

3. Estresse em Peixes

Segundo Barton (2002), a definição do estresse se dá pelo conjunto de respostas não específicas dos organismos às situações que tendem a desequilibrar sua homeostase, podendo ser considerado o principal fator responsável pelo acometimento de doenças e mortalidade na aquicultura (CONTE, 2004). O estresse pode ser caracterizado de acordo com as respostas fisiológicas do animal, apresentando-se de forma aguda (primária), crônica (secundária) e crônica prolongada (terciária) (PICKERING, 1981).

De acordo com Wedemeyer (1969), a resposta primária está relacionada com a liberação de catecolaminas pela ativação do sistema neuroendócrino, e aumento de sua concentração mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI), hormônios corticoides e liberação dos hormônios adrenocorticotróficos (ACTH). A resposta secundária inclui mudanças no sistema fisiológico devido ao aumento da pressão sanguínea, aumento da oxigenação e mobilização das reservas energéticas. Por sua vez, a resposta crônica prolongada ou também conhecida como terciária envolve o organismo animal como um todo podendo comprometer o crescimento, sistema imune e reprodução.

As respostas fisiológicas ligadas ao estresse se baseiam, principalmente, na maneira pela qual o animal é submetido a esse estímulo, ou seja, os agentes estressores são responsáveis pelo agravamento do estresse. Esses agentes podem ser de natureza física, como confinamento ou transporte; natureza química, baixa saturação de oxigênio dissolvido, oscilações do pH e contaminantes e estressores de origem biológica, como a presença de predadores (BARTON, 1997).

A oscilação térmica representa um dos fatores estressantes que pode acometer diariamente a produção de peixes. Com aumento da temperatura da água e, conseqüente, diminuição de oxigênio dissolvido ocorrem estímulos nos processos

metabólicos dos peixes exigindo consumo elevado de oxigênio por esses animais, com maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), o que gera acúmulo de produtos secundários da metabolização do oxigênio, podendo resultar em estresse oxidativo (PARIHAR e DUBEY, 1995).

A diminuição da saturação de oxigênio dissolvido na água induz os peixes ao estresse oxidativo. Peixes submetidos à hipóxia apresentaram aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no fígado (LUSHCHAK et al., 2001). Resultado este, segundo os autores, devido à preparação ao estresse oxidativo, pois quando esses animais são expostos a baixos níveis de oxigênio dissolvido têm a capacidade de elevar o potencial antioxidante, a fim de evitar danos oxidativos (OEHLERS et al., 2007).

O estresse oxidativo oriundo de hipóxia se dá devido ao aumento da capacidade redutora da cadeia respiratória, associado ao acúmulo de cofatores com forte potencial redutor nas células, podendo elevar a síntese de moléculas de ânion superóxido (O_2^-) pela cadeia transportadora de elétrons (FREEMAN e CRAPO, 1982). Resultados encontrados por Kramer e Pearlstein (1983) demonstraram que abaixa concentração de oxigênio provoca mudanças reversíveis na fosforilação oxidativa durante a síntese de ATP.

Além do estresse oxidativo, a baixa saturação do oxigênio e a alta temperatura acarretam em alterações no perfil hematológico. Foi demonstrado em estudos anteriores que peixes submetidos ao estresse térmico apresentaram aumento da taxa de hemoglobina, provavelmente como tentativa em manter a oxigenação dos tecidos a (TEIXEIRA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2016). Determinaram, ainda, aumento significativo nos níveis plasmáticos de albumina e relação albumina:globulina, visando a manutenção da homeostase.

Sob condições de estresse térmico, peixes podem apresentar diminuição na contagem de neutrófilos, como demonstrado por TEIXEIRA et al., (2012). Esta condição ocorre, pois, a temperatura da água é um dos principais fatores estressantes para os peixes, e assim proporciona maior suscetibilidade a patógenos (FALCON et al., 2007).

4. Sistema Antioxidante

Segundo Degáspari e Waszczynskyj (2004), antioxidantes são compostos com capacidade de retardar ou inibir a oxidação de diferentes grupos celulares com intuito de desencadear reações de oxidação em cadeia. Devido ao metabolismo oxidativo ter como função a produção de energia necessária para as atividades celulares essenciais, nas células vivas o metabolismo do oxigênio gera como produto de reação os denominados radicais livres, que por sua vez, são resultados do metabolismo normal, e que se não forem controlados, podem provocar danos as células (ABATE et al., 1990; ARCHER et al., 1994).

Nos animais aquáticos as ações dos antioxidantes compreendem compostos de baixo e alto peso molecular (LIVINGSTONE, 2001). O primeiro grupo tem em sua estrutura, compostos solúveis em água: glutathione reduzida, ácido ascórbico (vitamina C), e também por carotenóides, retinol (vitamina A) e tocoferol (vitamina E), que por sua vez são lipossolúveis. Todos participam do sequestro de radicais livres e também atuam como cofatores, como por exemplo das enzimas glutathione peroxidase ou glutathione-S-transferase, que são dependentes de glutathione. Outro grupo antioxidante possui alto peso molecular e consiste em proteínas específicas ou não específicas. As específicas incluem enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase (Figura 2), já as não específicas, são representadas por proteínas com íons de metais de transição (ferros e cobre), tais como metalotioneínas e ferritina.

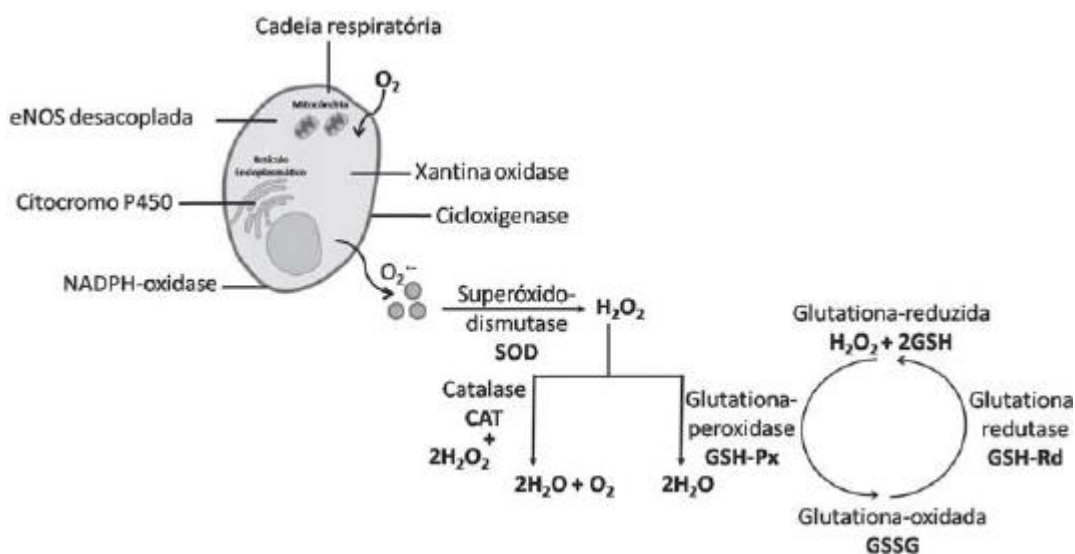


Figura 1 - Ação das enzimas do sistema antioxidante (Fortuño et al., 2005).

Para o ótimo funcionamento do sistema aeróbico, o equilíbrio entre a produção de EROs e a quantidade removida pelo sistema antioxidante é essencial. A produção de antioxidantes normalmente corresponde às necessidades de organismos e está sujeito a regulação ativa, sendo que o nível de antioxidantes no organismo está relacionado a diferentes fatores, tais como absorção, síntese, transporte, metabolização, inativação e excreção. Carotenóides, tocoferol, ácido ascórbico entre outros compostos são obtidos pelos animais aquáticos na ingestão de dietas balanceadas, já o grupo de alto peso molecular, o animal possui a capacidade de sintetizar (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

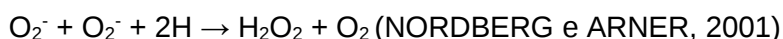
O sistema antioxidante existente nas células, enzimático ou não enzimático, age na remoção do excesso das EROs antes do acometimento de lesão (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As enzimas antioxidantes são importantes para a contenção da toxicidade do oxigênio, pois entram em ação quando se esgotam as reservas de suplementos de compostos antioxidantes (AHMAD, 1995).

Em peixes, os estudos sobre as defesas antioxidantes são recentes, com análises comparativas relacionadas aos níveis de atividade das enzimas antioxidantes em diferentes tecidos (MATKOVICS et al., 1977; SMITH e SHRIFT, 1979; AKSNES e NJAA, 1981; MORRIS e ALBRIGHT, 1984; WITAS et al., 1984; CASSINI et al., 1993; WILHELM FILHO e BOVERIS, 1993). A maioria das pesquisas relacionadas ao sistema antioxidante tem avaliado peixes que sofreram algum tipo de intoxicação por agentes

químicos na água sendo, portanto, os animais aquáticos caracterizados como bioindicadores de poluentes (DIGIULIO et al., 1989; WINSTON, 1991; BAINY et al., 1996). Em vista disso, existe a necessidade de pesquisas relacionadas ao estudo da atividade das enzimas do sistema antioxidante relacionadas à aditivos na ração como forma de melhorar as repostas fisiológicas ao estresse imposto pela intensificação da produção animal.

4.1 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

Após metabolização do oxigênio molecular é gerado o radical superóxido (O_2^-) pela adição de um elétron, sendo altamente reativo, possui capacidade de atravessar a parede da membrana lipídica. Além dessa ação tóxica esse radical possui outra ação deletéria, sendo responsável pela geração do radical hidroxil, composto que tem maior reatividade química (FRIDOVICH, 1978, 1986).



A formação do superóxido ocorre espontaneamente, principalmente no ambiente aeróbico, no qual contem elétrons entre a membrana mitocondrial interna com a cadeia respiratória. Esse radical também é gerado endogenamente por enzimas: xantina oxidase, ciclo-oxigenase e lipoxigenase (MCCORD e FRIDOVICH, 1969). O complexo enzimático NADPH-oxidase é importante devido à produção deliberada de superóxido. Duas moléculas de O_2^- devem ser metabolizadas a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo essa reação acelerada pela superóxido dismutase (SOD) (YOST e FRIDOVICH, 1973).

Na tentativa de combater a oxidação lipídica da membrana eritrocitária, essa enzima é presente em eucariotos em duas isoformas dependentes de metal, Mn-SOD agindo na mitocôndria, e a forma dimérica Cu/Zn-SOD no citosol celular. A reação catalítica da superóxido dismutase é limitada apenas pela difusão do radical livre (WEISIGER e FRIDOVICH, 1973).

4.2. Catalase (EC 1.11.1.6)

Como componente enzimático de defesa antioxidante, a catalase desempenha papel em duas funções importantes: dissociação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular ($\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) e, a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis (AEBI, 1984). A catalase é encontrada nos peroxissomos, que são organelas esféricas envoltas por uma membrana vesicular, presentes nos animais e vegetais, maneira pela qual a célula se defende das EROs, pois no interior dessas células encontram-se altas quantidades dessa enzima (KIRKMAN et al., 1999).



Esta enzima é encontrada em todos os tecidos dos animais, mas principalmente no fígado e sangue de animais superiores, entretanto em peixes a catalase não teve sua ação constatada em eritrócitos de algumas espécies (RABIE et al., 1972; SMITH, 1976; WILHELM FILHO e MARCON, 1996).

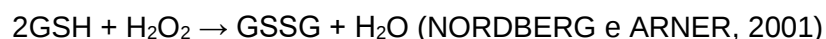
4.3 Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9)

Glutathione, um tripeptídeo existente nos organismos na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), pode atuar direta ou indiretamente em diferentes processos biológicos importantes, tais como a síntese de proteínas e proteção celular (URSINI et al., 1995). Anomalias no metabolismo e síntese da glutathione estão associados a doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DE HAAN et al., 1998).

Membranas celulares e intracelulares são alvos dos radicais livres por possuírem quantidades elevadas de ácidos graxos polinsaturados. Danos causados em recorrência desse ataque as células ocorrem devido a oxidação dos fosfolípidos e proteínas das membranas celulares (BJÖRNSTEDT et al., 1994). Assim, o sistema de defesa enzimático é importante na redução de radicais livres presentes no organismo, sendo a glutathione peroxidase uma das enzimas relacionadas (EPP et al., 1983).

Descrita por Mills (1957), é um dos meios de controle do organismo no combate aos elevados níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos dos ataques a membrana pelas EROs (KELNER et al., 1990). Essa enzima e suas isoformas

estão relacionadas à redução do H_2O_2 em água utilizando a glutathione como substrato e os hidoperóxidos lipídicos em álcoois (HO et al., 1997). A manutenção da glutathione reduzida (GSH) é realizada pela atividade da enzima glutathione redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter a glutathione na forma reduzida, como substrato para a glutathione peroxidase (AMSTRONG, 1997).



Com base nessas informações, o estudo propõe avaliar a suplementação dietética do frit de laranja sobre os parâmetros de desempenho produtivo, bioquímicos e hematológicos que possam garantir a saúde da tilápia-do-Nilo, tanto em condições normais como submetidas ao estresse térmico.

Capítulo II: “Dietary orange frit on antioxidant capacity and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress” foi redigido de acordo com as normas do periódico **Aquaculture** (impact fator 1.893).

5. Referências

- ABATE, C.; PATEL, L.; RAUSCHER, F. J. III; CURRAN, T. Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. **Science**, Washington, v. 249, p. 1157–1161, 1990.
- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, Marryland Hights, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, S. Oxidative stress from environmental pollutants. **Archives of insect biochemistry and physiology**, Hoboken, v. 29, n. 2, p. 135-157, 1995.
- AKSNES, A.; NJAA, L. R. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 69B, p. 893-896, 1981.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 10, p. 2-18, 1997.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K-channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 91, p. 7583-7587, 1994.
- AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 115- 120, 2006.
- BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 34, p. 151-162, 1996.
- BARCELLOS, L. J. G; KREUTZ, L. C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 229-236, 2004.
- BARROS, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, Chichester, v.40, p.895-903, 2009.
- BARTON, B. A.; DWYER, W. P. Physiological stress effects of continuous and pulsed DC electroshock on juvenile bull trout. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 51, n. 5, p. 998-1008, 1997.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, p.515, 2002.

BENDHACK, F. **Respostas fisiológicas do matrinxã *Brycon amazonicus* após mudança de ambientes com diferentes concentrações de sais de cálcio e de sódio**. 2008. 97 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008

BJÖRNSTEDT, M.; XUE, J.; HUANG, W.; ÅKESSON, B.; Holmgren, A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 269:29382–29384; 1994.

CASSINI, A.; FAVERO, M. AND ALBERGONI, V. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, 106C: 333-336, 1993.

CONTE, F. S. Stress and welfare of culture fish. **Applied Animal Behavior Science**, Oxford, v. 86, p.205, 2004.

COSTA, R. P.; MENENDEZ, G.; BRICARELLO, L. P.; ELIAS, M. C.; ITO, M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 819-832, 2000.

DAMASCENO F. M.; FLEURI, L. F.; SARTORI, M. M. P.; AMORIM, R. L.; PEZZATO, L. E.; SILVA, R. L.; CARVALHO, P. L. P. F.; BARROS, M. M. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. **Aquaculture**, Amsterdam, 454. 257-264. 2016

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELGADO, C. H. O.; FLEURI, L. F. Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description – A review. **Food Reviews International**, New York, 32. 1-14, 2015.

De HAAN, J. B.; BLADIER, C.; GRIFFITHS, P.; KELNER, M.; O'SHEA, R. D.; CHEUNG, N. S.; BRONSON, R. T.; SILVESTRO, M. J.; WILD, S.; ZHENG, S. S.; BEART, P. M.; HERTZOG, P. J.; KOLA, I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, 273:22528–22536; 1998.

DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C. AND WENNING, R.J. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environmental Toxicology Chemistry**, Hoboken, 8: 11031123, 1989.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. **European Journal of Biochemistry**, Chichester, 133:51–69; 1983.

FALCON, D. R.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; SAMPAIO, F. G.; HISANO, H. Physiological Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*, Fed Vitamin C- and Lipid-Supplemented Diets and Submitted to Low-Temperature Stress. **Journal of the World Aquaculture society**, Hoboken, 38, 287-295. 2007

FALCON, D. R.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; SOLARTE, W. V. N.; GUIMARÃES, E. G. Leucograma da tilápia-do-Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina c e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 543-551, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

FORTUÑO, A.; SAN JOSÉ, G.; MORENO, M.U.; DÍEZ, J.; ZALBA, G. Oxidative Stress and vascular remodelling. **Experimental Physiology**, Chischester, v. 90, n. 4, p. 457-462, 2005.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Labortory Investigation**, London, 47: 412-426, 1982.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, Washington, 201: 875-880, 1978.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **Advance in Enzymology**, Hoboken, 58: 62-97, 1986.

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

HO, Y.; MAGNENAT, J.; BRONSON, R. T.; CAO, J.; GARGANO, M.; SUGAWARA, M.; FUNK, C. D. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, 272:16644–16651; 1997.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

KELNER, M. J.; BAGNELL, R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector. Explanation for variations in paraquat resistance. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, 265:10872–10875; 1990.

KRAMER, R. S.; PEARLSTEIN, R. D. Reversible uncoupling of oxidative phosphorylation at low oxygen tension. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, 80: 5807-4811, (1983).

KIRKMAN, H. N.; ROLFO, M.; FERRARIS, A. M.; GAETANI, G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, 274:13908–13914; 1999.

LAY, P. A.; BALDWIN, J. What determines the size of telost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrechr, 20: 31-35, 1999.

LEHMANN, J.; STUERENBERG, F. J.; MOCK, D. The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, 4: 174-183, 1987.

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

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physioliology**, Bethesda, 280, 100–107. 2001.

MARTINS, C. R.; FARIAS, R. M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MATIAS, M. D. F. O.; OLIVEIRA, E. L. D.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. D. A. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 48(SPE), 143-150. 2005.

MATKOVICS, B.; NOVAK, R.; HANH, H. D.; SZABÓ, L.; VARGA, S. Z. I.; ZALESNA, G. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, 56B: 31-34, 1977.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Rocville, 244:6049–6055; 1969

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p.193-201, 2008.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, 229(1), 189-197. 1957.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA Saiba mais. Brasília, DF: 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus/saiba-mais>>. Acesso em: 20 dez. 2016

MORRIS, S. M.; ALBRIGHT, J. T. Catalase, glutathione peroxide, and superoxide dismutase in the rete mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, 232: 29-39, 1984.

NASCIMENTO M. G. **Produção enzimática de peróxi-ácidos e sua utilização na epoxidação de terpenos**. 2008. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OEHLERS, L. P.; PEREZ, A. N.; WALTER, R. B. Detection of hypoxia-related proteins in medaka (*Oryzias latipes*) brain tissue by difference gel electrophoresis and de novo sequencing of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, C 145, 120–133, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Jodhpur, v. 77, n. 2, p. 149-162, 1999.

PARIHAR, M. S.; DUBEY, A. K. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, C 112, 309–313, 1995.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O. V.; GAAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BENNETT, R. N.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.

PICKERING, A. D. **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981. p. 11-47

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZA, R. Avaliação in vitro do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.

QUEIROZ, C. E. E.; MENEZES H. C. Suco de laranja. **Tecnologia de bebidas**: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 221-254.

RABIE, F.; MAGID, A.M.A.; GUMA'A, K.A. AND KARRAR, O. Evolution of catalase in fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, Philadelphia, 43A: 1053-1055, 1972.

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

RANZINI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2. 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007.

REDDY, G. V. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus species* (*P. ostreatus* and *P. sajor caju*). **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2007.

ROSALES, E.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Journal of Food Engineering**, London, v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In.: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 330-45.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática. In: SILVA-SOUZA, A. T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R. M. (Org.). **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. Maringá: ABRAPOA, 2012. p. 221-242.

SMITH, A. C. Catalase in fish red blood cells. **Comparative Biochemistry Physiology**, Philadelphia, 54B: 331-332, 1976.

SMITH, J. SHRIFT, A. Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. **Comparative of Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, 63B: 39-44, 1979.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 131 p.

TEIXEIRA, C. P.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; FERNANDES, A. C.; KOCH, J. F. A.; PADOVANI, C. R. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. **Aquaculture Research**, Chichester, v.43, p.1081-1088, 2012.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos especiais de piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, 2004. p. 171-194.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; AUMANN, K. D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHE, L. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, 252:38-53, 1995.

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica organografia**: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Viçosa: Editora UFV, 2006.

VILLAS-BÔAS, S. L.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2002.

WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia. v. 29, p.1247-1251, 1969.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. **Journal of Biological Chemistry**. Rockville. 248:4793–4796; 1973.

WILHELM FILHO, D.; BOVERIS, A. Antioxidant defences in marine fish. II-Elasmobranchs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Philadelphia. 106C: 415-418. 1993.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 299-312.

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Philadelphia. 100C: 173-176, 1991.

WITAS, H.T.; GABRYELAK, T.; MATKOVICS, B. Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other Antarctic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Philadelphia. 77C: 409-411, 1984.

YOST, F. J. J.; FRIDOVICH, I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**. Rockville. 248:4905–4908; 1973.

CAPÍTULO II

Dietary orange frit on antioxidant capacity and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress

ABSTRACT The antioxidant capacity of dietary orange frit (OF) on growth, hematological profile and antioxidant enzymes activity of Nile tilapia subjected to heat-induced stress (HIS) was analyzed. A group of 440 male Nile tilapia ($31.7\text{g} \pm 0.34$) was randomly distributed in 40 250-L aquaria (11 fish/tank) and fed five practical diets with graded levels of OF at 0, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% OF orange frit kg^{-1} diet for 70 days. The diets were formulated to contain 26% digestible protein and 14.24 MJ digestible energy kg^{-1} . After the feeding period, growth performance, hematological profile and antioxidant enzymes activity were determined. Then, fish were subjected to HIS (32°C) for three days and the same hematological profile and antioxidant enzymes activity were determined. There was no statistical difference for growth performance among treatments. Fish fed 0 OF diet showed lower hematological profile after HIS ($P < 0.05$). Fish fed 0.6OF presented lower hematocrit and fed 0.8 OF lower hemoglobin and hematocrit after HIS. Fish fed 0.4 OF showed the lowest mean corpuscular volume (MCV) and the highest mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) comparing the values before and after HIS. Dietary orange frit determined different activities ($P < 0.05$) for catalase before HIS. Fish fed 0 OF diet showed the highest activity and 0.2 OF the lowest. After HIS fish fed 0 OF and 0.2 OF showed the lowest activity and 0.6 OF the highest ($P < 0.05$). A comparison of the values before and after HIS showed the highest values after stress. The highest activity for glutathione peroxidase, before HIS, was observed for fish fed 0 OF and the lowest for 0.2 and 0.4 OF ($P < 0.05$). After HIS the highest activity was determined for fish fed 0.6 OF and the lowest for fish fed 0.8 OF ($P < 0.05$). Dietary OF determined the highest enzymes activity when comparing values before and after stress. In sum, based on hematological profile and some antioxidant enzymes activities the dietary supplementation of 0.8 % of orange frit contributed to Nile tilapia maintain erythropoiesis and antioxidant capacity under heat-induced stress.

Keywords: antioxidant system, orange byproduct, orange peel fragment, *Oreochromis Niloticus*, temperature stress

Highlights:

- The activity of some Nile tilapia antioxidant enzymes were positively affected by dietary orange frit under stress.
- Dietary orange frit supports Nile tilapia maintain erythropoiesis under heat-induced stress.

- Dietary orange frit levels did not influence Nile tilapia growth.

Statement of relevance:

The confirmation of the antioxidant potential of orange frit will help improve formulations of functional diets for Nile tilapia.

1. Introduction

Over the past decades, the aquafeed industry has been focusing on the development of functional diets, which aim to improve not only fish growth, but also health condition and disease resistance. The economic losses caused by pathological agents has incited the researchers to find alternatives to antibiotics, whose use has been restricted in many countries (Tort, 2011; Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012; Barros et al., 2014; Vallejos-Vidal et al., 2016). Among many feedstuffs that may present functional properties, fruits and herbs, as well as their byproducts, have been shown as interesting alternatives due to their wide spectrum of biological activity (Cristani et al., 2007; Chakraborty and Hancz, 2011; Vaseeharan and Thaya, 2014). Additionally, the most important benefit of natural products use into fish diets is that neither do they cause any residues on the final products nor is there any negative effect on fish health or on human and environment (Baba et al., 2016).

Recent studies have shown that citrus, such as orange, lemon and their essential oils presents functional properties (Acar et al., 2015; Baba et al., 2016). According to literature, the orange oil (*Citrus sinensis*) comprises approximately 200 chemical components, such as terpene, monoterpene and phenolic compounds (Moufida and Marzouk, 2003; Flamini et al., 2007). Aiming to improve fish resistance, citrus essential oils have been tested. Acar et al. (2015) determined a positive effect of 0.1% dietary sweet orange peel essential oil (*Citrus sinensis*) on growth and disease resistance of *Oreochromis mossambicus* challenged with *Streptococcus iniae*. Working with the same fish species Baba et al. (2016) determined that the supplementation of 0.5% of *Citrus lemon* peels essential oil showed a positive effect on hematological and serum biochemical parameters, and on disease resistance against *Edwardsiella tarda*. Ngugi et al. (2016) evaluating *Citrus limon* peel essential oil on *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila* determined that 5% of dietary essential oil supplementation significantly improved biochemical, hematological and immunological responses. Shiu et al. (2016) demonstrated that 5% of *Citrus depressa* Hayata leaf meal dietary inclusion positively affected

immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in juvenile barramundi without impairing growth.

As presented, in most instances, researches have focused on citrus essential oil, therefore few studies has emphasized on other byproducts, such as leaf meal, fresh pulp and peel fragment. According to Delgado and Fleuri (2015) as a byproduct of orange juice processing, peel fragment or frit corresponds to the outer part of the epicarp, where the oil storage glands are located. Thus, epicarp presents a high concentration of carotenoids, limonene, phenolic compounds, and particularly flavonoids, which possess antioxidant properties (Morel et al., 1994).

Brazil is the biggest orange producer worldwide with forecast of 14.4 million tons for 2015/2016 harvest (USDA, 2016). According to MAPA (2015/2016) around 50% of worldwide and 80% of the Brazilian orange production result in industrialized orange juice, thus leading to a considerable quantity of solid and liquid residue. Therefore, there is a growing interest in efficient usage of agro-industrial residues. Several processes have been developed based on these materials as substrates in bioprocesses, whose use may help solve environmental problems, which are otherwise caused by their disposal (Reddy et al., 2002).

Therefore, the putative antioxidant capacity of orange frit (OF) was assessed aiming to improve Nile tilapia resistance under stress inherent to commercial fish production. First, Nile tilapia juveniles were fed dietary graded levels of orange frit and growth performance was evaluated. Then, hematological profile and some antioxidant enzymes activity were determined before and after fish were subjected to heat-induced stress.

2. Material and Methods

This research comprised two phases. In Phase I (70 days) fish were fed experimental diets containing different levels of orange frit (OF), in order to nutritionally prepare them to cope with stress. Growth performance was evaluated. In Phase II fish were submitted to heat-induced stress (HIS) for three days. Hematological profile and antioxidant enzyme activity were evaluated. The values before and after HIS were compared to better understand the putative nutritional effect of orange frit on Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) health.

2.1. Experimental diet (Phase I and II)

Five practical diets were prepared with graded levels of orange frit supplementation at 0 (0 OF, basal diet), 0.2% (0.2 OF), 0.4% (0.4 OF), 0.6% (0.6 OF) and 0.8% of OF diet (0.8 OF) (Table 1). These diets were formulated to contain 26% digestible protein and 14.24 MJ digestible energy kg⁻¹ (NRC, 2011). Diets were mechanically mixed with water (25% of dry weight) in a KitchenAid multi-functional mixer (Ação Científica®, Piracicaba, SP, Brazil) and extruded at 90°C in a single-screw laboratory extruder (Esteec, Ribeirão Preto, SP, Brazil). After, the diets were air dried overnight and stored at 5°C until further use. The chemical composition of the experimental diets and the orange frit were analyzed according to AOAC protocols (2000). The orange frit of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) osbeck) was obtained from JBTech Food® (Araraquara, SP, Brazil). At our laboratory, it was air-dried, ground and stored at 5°C until further use.

2.2 Feeding trial (Phase I)

A group of 440 male Nile tilapia fingerlings was obtained of commercial fish farm (Carlópolis, PR, Brazil), and transferred to AquaNutri Laboratory facilities (FMVZ, Botucatu, SP, Brazil). Fish were fed the basal diet with no OF for one week before starting the feeding period.

The experimental design was completely randomized and consisted of five treatments and eight replicates. Fish were fed until apparent satiation four times daily, and the feeding intake was evaluated weekly. A 70-day feeding trial was undertaken, and the growth performance was analyzed according to the levels of orange frit. Groups of 11 fish/tank with initial body weight of 31.7g ± 0.34 (mean ± SD) were randomly distributed in 40 250 L aquaria, being each aquarium considered an experimental unit. Aquaria were supplied with 6 L min⁻¹ dechlorinated tap water passing through a biological filter to reduce impurities and ammonia concentration. Water temperature was heater-controlled and kept at 25 ± 0.7°C, the dissolved oxygen level was 7.4 ± 0.33%, the total ammonia level was 0.02 ± 0.044 ppm, and the pH was 6.1 ± 0.21. The water quality parameters were monitored using an YSU 556® multi-probe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA) once a week. The ammonia concentration was determined using a commercial test kit (Alcon®, Camboriú, SC, Brazil). Once a week the tanks were cleaned with 10% of water exchange. The photoperiod was maintained at a 12:12 h light:dark schedule.

After the feeding period, the following growth performance parameters were calculated: Initial Body Weight (IBW) = g/fish

Final Body Weight (FBW) = g/fish

Weight Gain (WG) = FBW(g) – IBW (g)

Feed Intake (FI) = (g/fish)

Survival Rate (SUR) = (%)

Feed Conversion Rate (FCR) = FI/WG (feed:gain)

2.3. Stress and analysis (Phase I and II)

After 70 days of feeding, blood was collected from six anesthetized fish per treatment (benzocaine, 67 mg L⁻¹) in different aquaria to determine the hematological profile. After, a different group of fish, six per treatment, was anesthetized (benzocaine, 67 mg L⁻¹) and liver was collected to analyze the activity of antioxidant enzymes. These data were obtained before the fish were stressed. After three days of HIS (Teixeira et al., 2012; Damasceno et al., 2016), the same hematological profile and the antioxidant enzyme activity were also determined, but in different fish groups (six fish/treatment). The data obtained before and after HIS were compared, in order to analyze the ability of fish to cope with the stress.

2.4. Hematological assay (Phase I and II)

After fish were randomly collected and anesthetized with benzocaine solution (67 mg L⁻¹), blood was collected from the caudal vein using a tuberculin syringe rinsed with anticoagulant (3% EDTA, Vtec, Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brazil) for determination of red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), leukocyte (Leuk), total plasma protein (TPP) and albumin (ALB). Red blood cell (RBC) was determined by dilution and enumeration using hemocytometer. The hemoglobin was determined by the cyanometalhemoglobin colorimetric method using a commercial kit (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) according to Collier (1944). The hematocrit percentage was determined using the microhematocrit method described by Goldenfarb et al. (1971). The mean corpuscular volume [MCV = (Ht x 10) / erythrocytes] and the mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC = (Hb x 100) / Ht] were calculated according to Wintrobe (1934).

The leukocyte differentiation was performed in a blood extension stained with May-Grünwald-Giemsa-Wright according to Jain (1986). Differential counting was performed under a microscope at x100 in immersion oil. Two hundred cells was counted to establish the percentage of each cellular component.

The total plasma protein (TPP) was measured using a manual Goldberg refractometer by breaking the microhematocrit capillary just above the leucocyte layer after the hematocrit reading. The albumin concentration (ALB) was determined by the bromocresol method using the commercial kit Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) for colorimetric determination. The albumin:globulin ratio (A/G) was determined using albumin and total plasma protein values (Globulin = TPP – ALB; A/G = ALB/Globulin).

2.5. Antioxidant enzyme activity (Phase I and II)

Liver samples of fish obtained before and after HIS were used for antioxidant enzyme analyzes. Fish were killed by a lethal dose of benzocaine solution (300 mg L⁻¹). Liver samples were collected, immediately immersed in liquid nitrogen and stored frozen at -80°C until enzyme assay. Then, one gram of liver samples were 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 protein content assays. Total soluble protein content of the enzyme extract were determined according Bradford (1976).

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assayed according to the method of Beuchamp and Fridovich (1971), which measures one unit of SOD required to inhibit 50% of nitroblue tetrazolium (NBT). The reaction contained 1.0 mL of NBT 33 µmol L⁻¹, 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 0.25 mL of riboflavin 0.0033 mmol L⁻¹, 0.25 mL of methionine 10 mmol L⁻¹, 0.5 mL of EDTA 0.66 mmol L⁻¹ and 50 µL of liver sample. Total protein content was determined according to Bradford (1976). The inhibition of (NBT) was measured spectrophotometrically (Abs) at 560 nm.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed according to the method of Sinha (1972), by which dichromate in acetic acid is reduced to chromic acetate in the presence of H₂O₂ when heated, forming perchromic acid as an unstable intermediate. The reaction mixture contained 100 µL of liver samples, 500 µL of peroxide hydrogen, and after the reaction dichromate/acetic acid reagent (3:1) was used. The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 610 nm. The results expressed as U/mgpt.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was assayed according to the method of Flohé and Gützler (1984). Oxidized glutathione formed during the GPx reaction is immediately and continuously reduced by the excess activity of glutathione reductase providing a constant

level of glutathione (GSH). The concomitant NADPH oxidation can be monitored in a spectrophotometer. The reaction contained 300 μ L of phosphate buffer pH 7.4 0.1 M, 200 μ L of 2mM GSH, 300 μ L of liver samples. The reaction was stopped by the addition of 500 μ L of trichloroacetic acid (5%). Then, the reaction was centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes and the supernatant was collected. For each 100 μ L of supernatant were added 200 μ L of phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 and 700 μ L of DTNB (0.4 mg/mL). The absorbance reading was performed in spectrophotometer at 320 nm. The results expressed as U/mgpt.

2.6. Heat-induced stress (HIS) (Phase II)

After fish were collected for hematological profile and antioxidant enzyme activity analysis, the remaining fish were transferred to the challenge room. The experimental challenge room contained 30 40 L-plastic aquaria with filter and aeration, as well as a heating system to increase the water temperature. Sixty fish were randomly distributed at two fish per tank, and submitted to heat-induced stress by the gradual increase of the water temperature from 25 to 32°C for three days. At the end of HIS, the same initial hematological profile and antioxidant enzyme activity of six fish per treatment were evaluated. The fish were fed the same experimental diet as in feeding trial (Phase I). Hourly, the temperature and dissolved oxygen concentration were monitored using a YSI 556® multi-probe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA).

2.7. Statistical analysis

The variance analysis was used to evaluate the growth performance ($P < 0.05$) using the Tukey analysis of multiples comparisons. The antioxidant enzyme activity and hematological parameters were evaluated by a non-parametric test (Kruskal-Wallis) and complemented with Mann-Whitney test ($P < 0.05$). The statistical analyses were performed using Minitab® 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010).

2.8. Ethics statement

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University (protocol 113/2015 – CEUA).

3. Results

3.1. Phase 1

There was no statistical difference ($P > 0.05$) for the parameters of final body weight, weight gain, feed intake, feed conversion rate and survival among treatments (Table 2).

3.2. Phase 2

There was no statistical difference among treatments neither before nor after heat-induced stress ($P > 0.05$). Fish fed 0 OF diet showed lower RBC, Hb, Hct after HIS ($P < 0.05$) (Table 3). Fish fed 0.6 OF presented lower Htc and fed 0.8 OF lower Hb and Hct after HIS. As to hematimetric indices, fish fed 0.4 OF showed the lowest MCV and the highest MCHC comparing the vales before and after HIS. There was no statistical difference for TPP among treatments; however, there was difference ($P < 0.05$) for Alb comparing values before and after HIS for fish fed 0; 0.4; 0.6 and 0.8 OF treatments. Fish fed 0 OF showed the lowest values for A:G ratio ($P < 0.05$) (Table 4).

Fish fed 0.6 OF diet showed the highest values for lymphocytes (Lynf) before HIS ($P < 0.05$). After HIS fish fed 0.8 OF showed the highest neutrophils (Neutr) and monocytes (Mon) count. Fish fed diets with 0.8 OF presented the highest count for Mon when comparing values before and after HIS (Table 5).

Dietary orange frit determined different activities ($P < 0.05$) for CAT before HIS. Fish fed 0 OF diet showed the highest activity and 0.2 OF the lowest. After HIS fish fed 0 OF and 0.2 OF showed the lowest activity and 0.6 OF the highest ($P < 0.05$). A comparison of the values before and after HIS showed the highest values after stress.

As to GPx the highest value, before HIS, was observed for fish fed 0 OF and the lowest for 0.2 and 0.4 OF ($P < 0.05$). After HIS the highest activity was determined for fish fed 0.6 OF and the lowest for fish fed 0.8OF ($P < 0.05$). Fish fed diets supplemented with OF presented the highest activity when comparing values before and after stress.

4. Discussion

O oxigênio no seu estado molecular é essencial para diferentes processos metabólicos e fundamental para vida, porém, a dependência do seu consumo o torna tóxico (Ahmad, 1995), principalmente, pelo risco do estresse oxidativo (Davies, 2000). Em função da intensificação dos

sistemas de produção, peixes são submetidos a diferentes tipos de estresses, os quais podem determinar aumento de respostas fisiológicas, com maior demanda aos sistemas imune (Tort, 2011) e antioxidante (Winston and Di Giulio, 1991; Machado et al., 2014). Dentre os agentes estressores, a temperatura pode agir alterando a taxa metabólica (Wedemeyer and Wydoski, 2008) sendo que, em altas temperaturas ocorre não só o aumento do metabolismo (Lagerspetz, 1974), mas também a diminuição da capacidade de saturação do oxigênio dissolvido (Boyd, 1996) podendo gerar espécies reativas do oxigênio, o que põe em risco a integridade de membranas celulares (Winston and Di Giulio, 1991). Desta forma, a inclusão de frit de laranja foi testada visando melhora da capacidade do sistema antioxidante da tilápia-do-Nilo sob condições de estresse térmico.

No presente estudo, a inclusão do frit de laranja não teve influência no desempenho produtivo. Diferentemente, em estudo realizado com inclusão de óleo de laranja em dietas para tilápia-do-Nilo foi relatado aumento do ganho de peso e melhora na conversão alimentar de peixes alimentados com a dieta que continha 0.1% de óleo de laranja em comparação à inclusão de 0.3 e 0.5 % (Acar et al., 2015). Segundo os autores, isso se deve a sua ação direta ou indireta na microbiota intestinal (MacLennan et al., 2002), como aumento das vilosidades intestinais e aumento da síntese de células caliciformes, o que pode ter favorecido o crescimento dos peixes. A forma de inclusão do produto nas dietas pode ter determinado diferenças nos resultados entre pesquisas, uma vez que neste estudo o frit de laranja foi incorporado na ração na forma de farinha, o que provavelmente resultou em menor quantidade de compostos responsáveis pela melhora do crescimento, tais como terpenos, em relação à inclusão do óleo de laranja. A inclusão de óleo de limão (*Citrus limon*), igualmente a este estudo, não determinou melhora no crescimento da *Oreochromis mossambicus*, segundo os autores, devido a menor concentração do composto limoneno (Baba et al., 2016). No presente estudo, a taxa de sobrevivência não foi afetada pela inclusão do frit de laranja, sendo que as mortalidades registradas ocorreram, devido ao comportamento agonístico característico de espécies territorialistas, como a tilápia-do-Nilo.

Para utilização da análise hematológica como ferramenta para determinação da saúde dos peixes é preciso primeiro conhecer os valores normais que possam garantir a higidez do animal, pois existe ampla variação devido a fatores internos e externos (Ranzani-Paiva et al., 2014; Barros et al., 2014). Neste estudo o perfil hematológico dos peixes se manteve dentro da faixa de normalidade para tilápia-do-Nilo sadia de acordo com Falcon et al., (2007), Barros et al., (2009), Teixeira et al. (2012), Damasceno et al. (2016) determinados em condições experimentais semelhantes e, ainda, por Hrubec and Smith, (2010).

Foi observado que os peixes alimentados com a dieta controle (0 OF) não mantiveram a eritropoiese quando submetidos ao estresse térmico. Nesta condição esperava-se tentativa de

aumento, principalmente, na taxa de hemoglobina, uma vez que o aumento de temperatura acarreta diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água (Boyd, 1996). A melhora dos parâmetros, RBC e HB foi observada pela inclusão do frit de laranja pode ter ocorrido em função da presença de flavonoides, compostos esses com capacidade de evitar a peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos mantendo, portanto, o número de células vermelhas e, por conseguinte, a taxa de hemoglobina. Esse processo pode ocorrer, pois as membranas dos glóbulos vermelhos contêm lipídios insaturados e estão sujeitas a maiores danos oxidativos quando comparados com outros tecidos (Hubrec and Smith, 2010). A hemoglobina presente nos eritrócitos em situação de estresse oxidativo age como catalisador de peroxidação lipídica podendo, portanto, aumentar a velocidade das reações e produção de peróxido de hidrogênio (Asgary et al., 2005). Os dados da presente pesquisa corroboram com Acar et al. (2015), que determinaram melhora no perfil hematológico de *Oreochomis mossambicus* alimentadas com dietas suplementadas com 0.1% de óleo de laranja. As diferenças determinadas nos índices hematimétricos MCV e MCHC são decorrentes das alterações, mesmo que não significativas, da taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito.

A variação da temperatura da água é importante fator estressor, assim faz com que os peixes se torne debilitados e susceptíveis aos agentes patogênicos (Teixeira et al., 20012). No presente estudo a série branca dos peixes foi influenciada pelas dietas com inclusão do frit de laranja, como pode ser visto nos peixes que foram alimentados com a dieta que continha inclusão 0.6 OF quando comparados com os animais que se alimentaram de dietas isentas de frit de laranja. A função normal dos linfócitos dos peixes é dependente da membrana lipoproteica (van Acker et al., 1996), possivelmente os flavonoides presentes no frit de laranja foram suficientes para impedir lise celular dos linfócitos e assim os peixes conseguiram manter a quantidade de linfócitos circulantes após estresse térmico.

Os neutrófilos são responsáveis pela defesa primária na eliminação de microrganismos patogênicos e possuem como função primária fagocitar as bactérias. Já os Mon têm como função fagocitar os neutrófilos que sofreram apoptose após ingestão do patógeno invasor (Feldman et al., 2000). Os peixes alimentados com as diferentes dietas não apresentaram diferença na contagem de Neut e Mon antes do estresse térmico. Entretanto, quando submetidos ao estresse, os peixes arraçados com as dietas que continham inclusão de 0.8 OF apresentaram aumento de 34,38% na quantidade de monócitos quando comparados com peixes que receberam a mesma dieta experimental antes do desafio. Além disso, os peixes que foram alimentados com a dieta 0.0 OF apresentaram redução de 28.83% na quantidade de Mon circulantes após estresse térmico.

Comparando-se os tratamentos antes e após o estresse térmico, a proteína plasmática total não se alterou. Entretanto, quando os valores de proteínas foram comparados individualmente

entre os momentos, observou-se diminuição dos níveis de albumina no sangue após o estresse nos peixes arraçoados com as dietas 0; 0.4; 0.6 e 0.8 OF. Vale ressaltar que a proteína plasmática total é responsável pelo transporte de nutrientes e regulação osmótica. Já os níveis de globulina, proteína essa atuante na defesa do organismo, não apresentaram redução nos peixes dos diferentes tratamentos. O estresse pode ocasionar distúrbios osmóticos e iônicos em peixes de água doce, o que ocasiona decréscimo na capacidade de osmorregulação do plasma (Aragão et al., 2008; Costas et al., 2008; Shi et al., 2015). Dessa forma, é provável que os desequilíbrios entre os meios extracelular e intracelular tenham provocado mudanças no volume plasmático, determinando diminuição da albumina (Melo et al., 2009).

Em relação à atividade enzimática do sistema antioxidante, não era esperado aumento da atividade das enzimas antes do estresse térmico, entretanto, houve aumento da atividade da SOD e GPx nos peixes que receberam a dieta 0 OF. Possivelmente esse aumento ocorreu devido ao comportamento agonístico apresentado pelos peixes desse tratamento, o que resulta em estresse pelo constante confronto. A GPx elevada significa que houve aumento do peróxido de hidrogênio circulante, possivelmente isso ocorreu pela metabolização do ânion superóxido e sua redução pela SOD (Kappus and Sies, 1981; Halliwell and Gutteridge, 1999). Conforme descrito por Filho et al. (1993), o aumento do consumo de oxigênio por peixes em diferentes situações de estresse proporciona maior produção de EROs e demanda maior atividade das enzimas do sistema antioxidante. Como, ainda, descrito pelos mesmos autores ocorreu aumento da atividade da SOD no fígado e nos eritrócitos dos peixes que demandaram maior concentração de oxigênio.

Conforme esperado, após o estresse as enzimas CAT, SOD e GPx apresentaram maior atividade e o resultado mais elevado foi observado nos peixes que se alimentaram com a dieta que continha 0.6% de OF. Devido às condições de estresse térmico e hipóxia houve, provavelmente, mudanças adaptativas das funções da mitocôndria para garantir a oxigenação tecidual, porém essa adaptação proporciona aumento de EROs como resultado da oxidação da enzima xantina redutase em xantina oxidase, transformação essa visando garantir os níveis de oxigênio (Pörtner, 2002; Lushchak, 2011). Desta forma exigiu-se que os peixes estivessem em condições saudáveis para eliminar estes componentes tóxicos e garantir a homeostase. Resultados semelhantes foram descritos para diferentes espécies de organismos aquáticos sob condição de hipóxia, tais como: aumento da atividade da CAT em *Carassius auratus* (Lushchack et al., 2001), maior atividade da SOD em *Cyprinus carpio* (Vig and Nemcsók, 1989), aumento da GPx em *Leporinus elongatus* (Wilhelm Filho et al., 2005) e aumento da atividade da SOD, CAT e GPx em *Litoperanaeus vannamei* (Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín, 2011; Transriña-Arenas et al., 2013; Kniffin et al., 2014).

A baixa atividade da enzima GPx nos peixes do tratamento 0 OF após o estresse térmico é condizente com a condição de estresse em que os peixes se encontravam. Provavelmente a maior atividade dessa enzima nos peixes desse tratamento, antes do desafio imposto, consumiu as reservas de glutathione, já que GPx necessita desse cofator para poder eliminar o peróxido de hidrogênio e, portanto, não mantiveram a mesma atividade após o estresse. Outra hipótese pode ser a sugerida por Legatt et al. (2007), os quais determinaram que o aumento da temperatura da água para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) ocasionou diminuição da atividade da GPx, provavelmente pela desnaturação proteica e alteração no metabolismo de aminoácidos, já que a glutathione é formada pelos aminoácidos cisteína, ácido glutâmico e glicina (Cohen and Hochstein, 1963; Chambres and Harrison, 1993), sendo que esta desnaturação pode determinar diminuição da quantidade disponível desses compostos.

This research evaluated the putative antioxidant capacity of orange frit that could improve Nile tilapia resistance under stress inherent to commercial fish production. Therefore, our findings could help fish feed industry on functional diet formulation that could be used by fish producers as a nutritional strategy for minimizing fish disease and economic losses. Since, to our knowledge, this is the first research evaluating orange frit on Nile tilapia diet, further studies should be developed evaluating additional antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation and immune response, under different stress conditions and bacterial challenge. In sum, based on hematological profile and some antioxidant enzymes activities, the dietary supplementation of 0.8% of orange frit contributed to Nile tilapia maintain erythropoiesis and antioxidant capacity under heat-induced stress.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the São Paulo State Research Support – FAPESP (2015/18072-3) for the financial support.

6. References

- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N., Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437, 282-286.
- Ahmad, S., 1995. Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29, 135-157.
- Association of Official Agricultural Chemists, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, seventeenth ed. Arlington, 2000.
- Aragão, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino acids* 34, 143-148.
- Asgary, S., Naderi, G. H., Askari, N., 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Expe. & Clin. Card.* 10, 88.
- Baba, E., Acar, U., Öntas, C., Kebiç, O. S., Yılmaz, S., 2016. Evaluation of *Citrus limon* peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture* 465, 13-18
- Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquacult. Res.* 40, 895-903.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi, R.O., Pezzato, L.E., Fernandes Jr., Guimarães, I.G., Fernandes Jr., A.; Padovani, C.R., Sartori, M.M.P., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun.* 39, 188-195.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971 Superoxide dismutase: improved assay and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-287.
- Boyd, C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Bradford, M.M., 1976 A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinage binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chakraborty, S.B., Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Rev. in Aquac.*, 3, 103-119.
- Chambres, I.; Harrison, P. R.; Trends Biochem Sci. 1987, 12, 255; Hatfield, D.; Diamond, A.; Trends Genet., 1993, 9, 69
- Cohen, G.; Hochstein, P.; Biochemistry 1963, 2, 1420.

- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture. Res.* 39, 1-9.
- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550-552.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano G., Saija, A., Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agr. Food Chem.* 55, 6300-6308.
- Damasceno F. M., Fleuri, L. F., Sartori, M. M. P., Amorim, R. L., Pezzato, L. E., Silva, R. L., Carvalho, P. L. P. F., Barros, M. M., 2016. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. *Aquaculture.* 454, 257-264.
- Davies, K.J.A., 2000 Oxidative stress the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.
- Delgado, C.H.O., 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.
- Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Sampaio, F.G., Hisano, H., 2007. Physiological Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*, Fed Vitamin C- and Lipid-Supplemented Diets and Submitted to Low-Temperature Stress. *J. World Aquac. Soc.* 38, 287-295.
- Filho, D. W., Giulivi, A., Boveris, A., 1993 Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 409-413.
- Flamini, G., Tebano, M. Cioni, P. L., 2007. Volatiles emission patterns of diferente plants organs and pollen of *Citrus limon*. *Analy. Chim. Act.* 589, 120-124.
- Flohè, L.; Günzler, W.A., 1984. *Methods Enzymol.* 105, 114
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Path.*, 56, 3539.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*, third ed. Oxford University Press, New York.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.), *Schalm's veterinary hematology*, sixth ed. Blackwell Publishing, pp. 994-1003.
- Jain, N.C., 1986. *Schalm's veterinary haematology*, fourth ed. Lea e Febiger, Philadelphia.
- Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 111-133.

- Kniffin, C.D., Burnett, L.E., Burnett, K.G. 2014. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 170, 43–49.
- Kappus, H., & Sies, H. 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233-1241.
- Lagerspetz, K.Y.H., 1974. Temperature acclimation and nervous systems. *Biol. Rev.* 49, 477-514.
- Leggat, P.A., Kedjarune, U., Smith, D.R., 2007. Occupational health problems in modern dentistry: a review. *Ind. health*, 45, 611-621.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxy- genation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, 100–107.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
- Machado, C., Zaleski, T., Rodrigues, E., dos Santos Carvalho, C., Cadena, S.M.S.C., Gozzi, G. J., Donatti, L., 2014. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comp. Bioch. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 172, 21-28.
- MacLennan, A.H., Wilson, D.H., Taylor, A.W., 2002. The escalating cost and prevalence of alternative medicine. *Prev. Med.* 35, 166-173.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Melo, M.M., Júnior, D.V., Teixeira, E.A., Guimarães, S.R., 2009. Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia Nilotic (*Oreochromis Niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61, 1183-1190.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Saiba mais. MAPA, Brasília. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus/saiba-mais>. (accessed 20.12.16).
- Minitab Inc., 2010. Minitab: Data analysis software, release 16.1.1.0. Minitab Inc, State College.
- Moufida, S., Marzouk, B., 2003 Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.* 62, 1283-1289.
- Morel, L., Rudofsky, U.H., Longmate, J.A., Schiffenbauer, J., Wakeland, E.K., 1994. Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity*, 1, 219-229.
- Ngugi, C. C., Oyoo-Okoth, E., Muchiri, M., 2016. Effects of dietary level essential oil (EO) extract from bitter lemon (*Citrus limon*) fruit peels on growth, biochemical, haemato-immunological parameters and disease resistance in Juvenile *Labeo victorianus* fingerlings challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Res.* 1-13.

- National Research Council, 2011 Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp National Academies Press, Washington, DC.
- Oliva-Telles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. J. Fish. Dis. 35, 83-108.
- 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 318, 379–383.
- Pörtner, H. O., 2002 Climate variation and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comp. Biochem. Physiol. 132A, 739-761.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., Corleto, F., 2014. Hematologia e histopatologia de tilápia-do-Nilo exposta a concentrações sub-letais de selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \text{ Se}^{4+}$). Bol. Inst. Pesca, 40, 23-33.
- Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128, 9-17.
- Shi, Gui-Cheng, Dong, Xiao-Hui, Chen, Gang, Tan, Bei-Ping, Yang, Qi-Hui, Chi, ShuYan, Liu, Hong-Yu., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) under cold stress. Aquacult. Res., 46, 658-668.
- Shiu, Y., Kin, H., Chi, C., Yeh, S., Liu, C., 2016. Effects of hime lemon, *Citrus depressa* Hayata, leaf meal in diets on the immune response and disease resistance of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (bloch), against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immun. 55, 332-338.
- Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. Analytical biochemistry 47, 389-394.
- Trasviña-Arenas, C.H., García-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz Plascencia, G., 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. Comp. Biochem. Physiol. B 164, 44–52.
- Teixeira, C.P.; Barros, M.M.; Pezzato, L.E.; Fernandes Júnior, A.C.; Koch, J.F.; Padovani, C. R., 2012. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. Aquacul. Res. 43, 1081-1088.
- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. Dev. Comp. Immunol. 35, 1366-1375.
- United States Department of Agriculture, 2016. Economic Research Service. topics/international-markets-trade/countries-regions/brazil/trade.aspx#livestock. (accessed 20.12.16).
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. Fish Shellfish Immun. 56, 34-69.
- van Acker, S. A. B. E.; van den Berg, D-J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; van Bennekom, W. P.; van der Vugh, W. J. F.; Bast, A., 1996. Free Radical Biol. Med. 20, 331.

- Vaseeharan, B., Thaya, R., 2014. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 22, 1079-1091.
- Vig, É., Nemcsók, J., 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 35, 23–25.
- Wedemeyer, G. A., & Wydoski, R. S., 2008. Physiological response of some economically important freshwater salmonids to catch-and-release fishing. *North Am. J. Fish Mana.* 28(5), 1587-1596.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991 Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica* 51, 32-49
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244, 349–35

Table 1 - Formulation and chemical composition of the experimental diets.

	0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF
Soybean meal (g·kg ⁻¹)	555.85	558.8	559.5	560.2	560.8
Corn (g·kg ⁻¹)	392.3	389	385.3	381.6	377.9
Soybean oil (g·kg ⁻¹)	14.8	15.7	16.7	17.8	18.8
Methionine (g·kg ⁻¹)	2.18	2.19	2.19	2.19	2.2
Threonine (g·kg ⁻¹)	2.7	2.7	2.69	2.69	2.69
Tryptophan (g·kg ⁻¹)	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
Dicalcium phosphate (g·kg ⁻¹)	21.08	21.11	21.13	21.15	21.16
Vitamin C ¹ (g·kg ⁻¹)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Premix Vit/Min ² (g·kg ⁻¹)	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3
BHT ³ (g·kg ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Salt (g·kg ⁻¹)	1	1	1	1	1
Orange frit⁴ (%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
Chemical analysis					
Crude Protein (%)	29.84	29.72	30.07	30.65	30.61
Crude Energy (MJ·kg ⁻¹)	17.22	17.67	17.14	18.07	18.25
Ash (%)	5.87	5.87	5.90	5.99	5.99
Crude fiber (%)	3.51	3.37	3.30	3.53	3.90
Dry matter (%)	95.38	95.53	95.79	95.61	96.02

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

²Vitamin and Mineral Premix (kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg.

³Butylated hydroxytoluene – antioxidant.

⁴Orange Frit – Chemical composition: crude protein (6.14%), crude energy (17.36 MJ·kg⁻¹), crude fiber (14.64%), crude fat (4.31%)

Table 2 – Initial body weight (IBW), final body weight (FBW), weight gain (WG), feed intake (FI), feed conversion ratio (FCR), survival (SUR) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit for 70 days.

	Diets					P value
	0.0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF	
IBW (g)	31.98 (±0.34)	31.59 (±0.34)	31.70 (±0.32)	31.59 (±0.34)	31.76 (±0.29)	0.118
FBW (g)	114.34 (±11.23)	111.41 (± 8.51)	111.25 (±17.15)	106.7 (±7.85)	121.06 (±14.17)	0.241
WG (g)	82.35 (±11.39)	79.82 (±8.33)	79.55 (±17.02)	75.11 (±7.77)	89.3 (±14.27)	0.228
FI (g)	131.44 (±8.15)	127.34 (±5.26)	128.55 (±9.38)	124.6 (±7.89)	133.36 (±4.34)	0.152
FCR	1.7 (±0.34)	1.63 (±0.16)	1.72 (±0.35)	1.67 (±0.1)	1.53 (±0.24)	0.659
SUR (%)	88.63 (±15.93)	93.18 (±10.59)	94.31 (±6.76)	96.59 (±4.7)	97.77 (±4.2)	0.368

Values are means ± SD of 8 replicates. No significant difference at $P > 0.05$ (Tukey Test)

0 OF: no orange frit supplementation 0% of orange frit kg^{-1} diet; 0.2 OF: diet supplemented with 0.2 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.4 OF: diet supplemented with 0.4 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.6 OF: diet supplemented with 0.6 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.8 OF: diet supplemented with 0.8 % of orange frit kg^{-1} diet.

Table 3 – Hematological parameters of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.

		Diets					P value
		0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF	
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Before stress	2.34 A (2–2.7)	2.1 (1.76–2.7)	1.98 (1.75–2.28)	2.32 (1.72–2.57)	2.16 (1.8–2.25)	0.369
	After stress	1.92 B (1.71–2.05)	2.09 (1.31–2.62)	2.27 (1.25–2.7)	1.9 (1.49–2.44)	2.02 (1.88–2.21)	0.387
Hb ($\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$)	Before stress	9.71 A (9.36–11.59)	8.55 (7.65–11.18)	8.39 (7.77–9.4)	8.71 (7.58–9.74)	9.6 A (8.25–10)	0.051
	After stress	7.67 B (7.07–8.54)	8.19 (6.14–9.7)	8.83 (5.7–9.81)	7.89 (6.70–8.57)	7.63 B (6.89–8.27)	0.377
Hct (%)	Before stress	40.5 A (35–50)	36.75 (31–41.5)	36.25 (33–40)	36 A (35.5–40)	36 A (35.5–39.5)	0.261
	After stress	29.63 B (28.5–31.5)	31.25 (25–39.5)	33 (19–36.5)	31 B (28.50–34.5)	34 B (26.5–35)	0.813
MCV (fL)	Before stress	163.1 (148.29–215.52)	172 (141.43–201.06)	179.2 A (160.09–220.99)	163.5 (142.02–206.4)	174.5 (152.54–194.44)	0.808
	After stress	157 (148.78–166.67)	160.7 (128.02–190.84)	151.6 B (125.93–162.22)	164.9 (135.25–197.99)	159.4 (139.9–180.85)	0.512
MCHC (%)	Before stress	23.48 (21.96–26.86)	24.07 (21.05–27.45)	23.22 B (22.08–25.15)	24.05 (21.35–26.3)	25.33 (22.92–27.56)	0.405
	After stress	26 (24.59–27.11)	24.56 (22.97–30.64)	26.54 A (25.03–30)	25.01 (22.71–27.44)	23.59 (21.47–26.89)	0.191

Median and minimum – maximum values of 6 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 or after heat-induced stress by a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

0 OF: no orange frit supplementation 0% of orange frit kg^{-1} diet; 0.2 OF: diet supplemented with 0.2 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.4 OF: diet supplemented with 0.4 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.6 OF: diet supplemented with 0.6 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.8 OF: diet supplemented with 0.8 % of orange frit kg^{-1} diet.

Table 4 – Total plasma protein (TPP), albumin (Alb), globulin (Glob) and albumin:globulin ratio (A:G) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.

		Diets					P value
		0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF	
TPP (mg dL ⁻¹)	Before stress	4.4 (3.5–5)	3.72 (3.30–4.75)	4 (3.65–4.8)	3.92 (3.2–4.8)	4.05 (3.1–4.85)	0.481
	After stress	3.42 (2.9–3.85)	3.12 (2.95–4)	3.62 (2.95–4)	3.27 (2.95–4)	3.42 (2.75–4)	0.964
Alb (mg dL ⁻¹)	Before stress	1.63 A (1.49–1.72)	1.56 (0.96–1.82)	1.52 A (1.29–2.01)	1.48 A (1.39–1.83)	1.47 A (1.29–1.76)	0.79
	After stress	0.9 B (0.65–1.01)	0.88 (0.34–1.17)	0.92 B (0.72–1.8)	1.12 B (0.95–1.7)	0.84 B (0.53–1.36)	0.249
Glob (mg dL ⁻¹)	Before stress	2.87 (1.91–3.32)	2.51 (1.74–3.18)	2.39 (1.99–3.43)	2.28 (1.81–3.29)	2.48 (1.81–3.47)	0.888
	After stress	2.59 (1.96–2.98)	2.61 (1.78–2.93)	2.47 (1.83–3.28)	2.1 (1.67–3.04)	2.35 (1.84–3.37)	0.893
Alb:Glob	Before stress	0.55 A (0.49–0.83)	0.69 (0.32–0.99)	0.66 (0.40–1.01)	0.66 (0.46–0.84)	0.65 (0.40–0.71)	0.96
	After stress	0.37 B (0.22–0.48)	0.32 (0.12–0.66)	0.33 (0.22–0.97)	0.55 (0.32–0.79)	0.36 (0.16–0.74)	0.456

Median and minimum – maximum values of 6 replicates.

Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before or after heat-induced stress by a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

0 OF: no orange frit supplementation 0% of orange frit kg⁻¹ diet; 0.2 OF: diet supplemented with 0.2 % of orange frit kg⁻¹ diet; 0.4 OF: diet supplemented with 0.4 % of orange frit kg⁻¹ diet; 0.6 OF: diet supplemented with 0.6 % of orange frit kg⁻¹ diet; 0.8 OF: diet supplemented with 0.8 % of orange frit kg⁻¹ diet.

Table 5 – Lymphocytes (Lynf), neutrophil (Neutr) and monocytes (Mon) of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.

		Diets					P value
		0.0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF	
Lynf (cells μ^{-1})	Before stress	70744 b (48461 - 100265)	139615 ab (66413 - 160111)	98483 ab (77333 - 120519)	143100 a (160147 - 183658)	98024 abB (79225 - 156687)	0.025
	After stress	95668 (85317 - 170667)	116678 (62021 - 175993)	107323 (85755 - 215753)	135176 (102427 - 187122)	167582 A (120438 - 209871)	0.365
Neut (cells μ^{-1})	Before stress	3916 (2820 - 10563)	7159 A (4817 - 15038)	5021 (2646 - 29908)	9997 A (10114 - 15108)	5757 (878 - 12247)	0.231
	After stress	1962 b (1745 - 4376)	3684 abB (900 - 4529)	6148 ab (2326 - 8767)	3648 abB (1563 - 5232)	6682 a (5320 - 17909)	0.015
Mon (cells μ^{-1})	Before stress	756 A (512 - 3655)	3443 (715 - 9498)	2200 (882 - 3861)	1625 (1888 - 10957)	3342 B (994 - 6757)	0.283
	After stress	218 bB (0 - 490)	3279 ab (3135 - 4612)	3353 ab (930 - 4837)	2911 ab (1334 - 8910)	7833 aA (4433 - 11455)	0.012

Median and minimum – maximum values of 6 replicates.

Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before or after heat-induced stress by a Mann-Whitney test ($P < 0.05$); lowercase letters compare the levels of orange frit among treatment by a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

0 OF: no orange frit supplementation 0% of orange frit kg^{-1} diet; 0.2 OF: diet supplemented with 0.2 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.4 OF: diet supplemented with 0.4 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.6 OF: diet supplemented with 0.6 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.8 OF: diet supplemented with 0.8 % of orange frit kg^{-1} diet.

Table 6 - Antioxidant enzyme activity of Nile tilapia fed diet supplemented with graded levels of orange frit and subjected heat-induced stress.

		Diets					P value
		0 OF	0.2 OF	0.4 OF	0.6 OF	0.8 OF	
SOD U/mgpt	Before stress	19.71 aB (19.25–20.91)	13.06 cB (12.39–13.73)	15.06 bB (13.96–15.88)	15.2 bB (14.41–16.41)	15.07 bB (14.1–15.35)	0.0001
	After stress	22.81 cA (22.23–24.83)	16.64 cA (16.04–17.55)	23.35 cA (22.05–24.48)	35.4 aA (29.7–47.15)	29.08 abA (25.42–38.79)	0.0001
CAT U/mgpt	Before stress	69.23 B (61.83–77.38)	54.33 B (20.9–69.04)	61.62 B (41.62–67.64)	57.23 B (28.54–71.93)	58.92 B (45.08–72.19)	0.0001
	After stress	86.52 cA (69.64–99.92)	69.26 cA (61.84–84.1)	123.65 bA (117.69–130.48)	166.84 aA (150.02–186.88)	130.45 aA (110.55–138.84)	0.0001
GPx U/mgpt	Before stress	55.53 aA (63.38–64.42)	37.43 bB (24.31–48.37)	29.58 bB (15.58–51.21)	47.09 abB (35.68–65.28)	50.2 abB (35.12–54.49)	0.024
	After stress	68.34 cA (44.12–93.83)	63.23 cA (55.96–72.04)	65.46 cA (53.39–100.05)	154.07 aA (140.14–177.18)	133.34 bA (92.73–147.22)	0.0001

Median and minimum – maximum values of 6 replicates.

Uppercase letters compare the hematological response of fish in the same treatment before or after heat-induced stress by a Mann-Whitney test ($P < 0.05$); lowercase letters compare the levels of orange frit among treatment by a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathion peroxidase

0 OF: no orange frit supplementation 0% of orange frit kg^{-1} diet; 0.2 OF: diet supplemented with 0.2 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.4 OF: diet supplemented with 0.4 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.6 OF: diet supplemented with 0.6 % of orange frit kg^{-1} diet; 0.8 OF: diet supplemented with 0.8 % of orange frit kg^{-1} diet.

Capítulo III

Implicações

No presente estudo foi demonstrado o uso benéfico de aditivos alternativos na nutrição e saúde dos peixes. Mesmo não tendo sido observada diferença estatística para o desempenho dos animais houve melhora significativa na saúde das tilápias-do-Nilo quando submetidas ao estresse térmico tornando-a mais preparada frente às adversidades as quais os peixes são expostos durante a criação comercial.

As respostas ao estresse observadas neste estudo, demonstraram que os nutrientes da dieta forneceram substratos para serem utilizados como antioxidantes, os quais favoreceram a ação das enzimas do sistema antioxidante e mantiveram os parâmetros sanguíneos na faixa para peixes saudáveis quando desafiados.

Concomitantemente, o uso dos aditivos alternativos na nutrição animal possibilita o uso racional de co-produtos e/ou resíduos da produção de sucos de frutas, impedindo-os de serem depositados no ambiente e, assim, elevar o uso sustentável desses alimentos. Portanto, tornam-se necessárias pesquisas futuras para estabelecer melhor os efeitos benéficos desses produtos, no caso, frit de laranja, para ser utilizado em rações comerciais.