

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DA DIETA ENRIQUECIDA COM RUTINA  
SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E  
BIOMARCADORES OXIDATIVOS EM JUNDIÁS  
(*Rhamdia quelen*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Tanise da Silva Pês**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**EFEITO DA DIETA ENRIQUECIDA COM RUTINA SOBRE  
OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E BIOMARCADORES  
OXIDATIVOS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

**Tanise da Silva Pês**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Amália Pavanato**

**Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**EFEITO DA DIETA ENRIQUECIDA COM RUTINA SOBRE OS  
PARÂMETROS SANGUÍNEOS E BIOMARCADORES OXIDATIVOS  
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

elaborada por  
**Tanise da Silva Pês**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Maria Amália Pavanato, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Bernardo Baldisserotto, Dr.**  
(Co-orientador)

---

**Luciano de Oliveira Garcia, Dr.**  
(FURG)

---

**Vania Lucia Loro Dr<sup>a</sup>.**  
(UFSM)

Santa Maria, 14 de agosto de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Guilherme e Fátima que me ensinaram a  
perseguir meu ideal com dedicação e coragem.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo especiais.

A minha orientadora, Maria Amália Pavanato, pelo apoio, incentivo, paciência e carinho durante essa fase de amadurecimento pessoal e profissional. Por confiar em mim e por sempre motivar meu desenvolvimento intelectual.

Ao meu co-orientador Prof. Bernardo Baldisserotto o meu sincero agradecimento pelo profissionalismo, amizade e total disponibilidade. O seu apoio e sabedoria foram essenciais na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. João Radünz Neto pela confiança, receptividade, disponibilidade e auxílio durante o experimento.

Ao Prof. Luciano Garcia, Prof<sup>a</sup>. Vania Loro e Prof. Mauro Cunha por aceitarem participar da Banca de Defesa desta Dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação e a secretária Zeli Carvalho, sempre prestativa e disposta a ajudar.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

Aos colegas, Daniel Rotili, Etiane Saccol, Érika Londero, Caroline Azzolin, Giovana Ourique, Isabela Finamor, Jéssica Dalenogare, Juliano Uczay, Luciane Gressler, Sun Hee e demais colegas pelo auxílio nos experimentos, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, companheirismo, amizade, dedicação e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais, Guilherme e Fátima minhas bases, simplesmente por terem me feito existir, pelo amor, por tudo o que sou, por terem me proporcionado educação e por sempre me estimularem a continuar.

A minha irmã, Patrícia, pelo incentivo, alegrias e amizade.

Ao meu namorado, Francisco Wesz pela paciência, por estar o tempo todo ao meu lado, nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final des difícil, porém gratificante etapa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta Dissertação de Mestrado.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

A todos, muito obrigada!

*“Se as coisas são inatingíveis... Ora, não é motivo para não querê-las... que tristes os caminhos que não fora a presença distante das estrelas...”*

*Mário Quintana*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO DA DIETA ENRIQUECIDA COM RUTINA SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E BIOMARCADORES OXIDATIVOS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

AUTORA: Tanise da Silva Pês  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Maria Amália Pavanato  
CO-ORIENTADOR: Dr. Bernardo Baldisserotto  
Data e local da defesa: Santa Maria, 14 de agosto de 2014.

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é uma das espécies mais cultivadas no sul do Brasil. Produtos destinados a melhorar o cultivo e produção do jundiá são necessários devido à importância desta espécie para a aquicultura. O estresse oxidativo (OS, do inglês *oxidative stress*) é um dos principais desafios no domínio da piscicultura, portanto a utilização de compostos com capacidade antioxidante pode ser útil. O flavonoide rutina tem vários efeitos benéficos e torna-se uma alternativa importante a fim de reduzir as alterações fisiológicas resultantes do estresse atrelado ao cultivo. Este estudo avaliou a influência de três dietas contendo a rutina (0, 0,15 e 0,30 % rutina) sobre os parâmetros sanguíneos e resposta antioxidante em jundiás. Após um período de 21 dias de alimentação, o sangue foi coletado para a análise sanguínea. Os peixes foram então eutanasiados para amostragem do encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo. Uma alíquota de sangue foi amostrada para a análise bioquímica e do cortisol plasmático. Os biomarcadores de OS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (NPSH), conteúdo de ácido ascórbico (AA) e a capacidade antioxidante total (TRAP) foram determinados. Os peixes que receberam a dieta contendo 0,15 % rutina apresentaram níveis de cortisol mais baixos do que o controle. No entanto, a dieta contendo rutina não influenciou os parâmetros hematológicos. Os níveis de lipoperoxidação medidos por determinação de TBARS e LOOH no encéfalo, brânquias, fígado e músculo diminuíram nos peixes que receberam a dieta contendo rutina; exceto no rim onde houve apenas a redução dos níveis de LOOH em todas as dietas. Quando comparado ao controle, a dieta enriquecida com rutina aumentou a atividade da SOD, CAT, o conteúdo de NPSH, AA e TRAP no encéfalo, GST e TRAP nas brânquias, SOD, CAT e GST, o conteúdo de NPSH, AA e TRAP no fígado, CAT, GST e TRAP no rim, GPx, conteúdo de NPSH, AA e TRAP no músculo. Em conclusão, estes resultados sugerem que a suplementação contendo rutina na dieta do jundiá é recomendada pois aumenta a resposta antioxidante no tecido, evitando o dano oxidativo.

**Palavras-chave:** Peixes. Flavonoide. Defesas antioxidantes. Estresse Oxidativo.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduating in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **EFFECT OF DIETS ENRICHED WITH RUTIN ON BLOOD PARAMETERS AND OXIDATIVE BIOMARKERS IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*)**

AUTHOR: Tanise da Silva Pês

ADVISER: Dr<sup>a</sup>. Maria Amália Pavanato

CO-ADVISER: Dr. Bernardo Baldisserotto

Date and place of defense: August 14, 2014, Santa Maria.

Silver catfish, *Rhamdia quelen*, is one of the most cultivated fish species in southern Brazil. Products destined for improving rearing and production of this species are required due to its importance for aquaculture. Oxidative stress (OS) is one of the main challenges in fish culture, so the use of compounds with antioxidant capacity may be valuable. The flavonoid rutin has several beneficial effects and represents an important alternative to reduce the physiological changes that arise from rearing-related stress. This study evaluated the influence of three diets containing rutin (0, 0.15 and 0.30 % rutin) on blood parameters and the antioxidant response of silver catfish. After a 21-day feeding period, blood was withdrawn for biochemical analysis and determination of plasma cortisol levels. The fish were then euthanized for sampling of the brain, gills, liver, kidney and muscle. Biomarkers of OS, thiobarbituric reactive substances (TBARS), lipid hydroperoxides (LOOH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), content of non-protein thiol groups (NPSH), content of ascorbic acid (AA) and total antioxidant capacity (TRAP) were determined. Fish fed the diet having 0.15 % rutin had lower cortisol levels compared to control. Nonetheless, the diet with rutin did not affect the hematological parameters. The levels of lipid peroxidation measured by determination of TBARS and LOOH in the brain, gills, liver and muscle decreased in the fish fed the diet containing rutin; in the kidney, however, only the levels of LOOH were reduced in these fish. When compared to control, the rutin-enriched diet increased the activity of SOD, CAT, NPSH content, AA and TRAP in the brain, GST and TRAP in the gills, SOD, CAT, GST, NPSH content, AA and TRAP in the liver, CAT, GST and TRAP in the kidney, and GPx, NPSH content, AA and TRAP in the muscle. In conclusion, these results suggest that rutin supplementation in silver catfish diet is recommended because it increases the tissue antioxidant response, thus preventing oxidative damage.

**Keywords:** Fish; Flavonoid; Antioxidant defenses; Oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplo de jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> .....	17
Figura 2- Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio .....	19
Figura 3- Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes .....	24
Figura 4- Estrutura química dos flavonoides .....	26
Figura 5- Estrutura química do flavonoide rutina .....	27

## LISTA DE TABELAS

Table 1- Formulation (%) of the experimental diet .....	56
Table 2- Hematological and biochemical parameters of the silver catfish <i>Rhamdia quelen</i> fed with diets containing different concentrations of rutin.....	57
Table 3- Biomarkers of oxidative stress in the brain, gills and liver of <i>Rhamdia quelen</i> fed diets containing different concentrations of rutin.....	58
Table 4- Biomarkers of oxidative stress in the kidneys and muscle of <i>Rhamdia quelen</i> fed diets containing different concentrations of rutin.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Total phenolic content of diets containing different concentrations of rutin. The data appear as the mean  $\pm$  SEM (n = 3). Different letters denote that data are significantly different from the control at P < 0.05. GAE, gallic acid equivalents..... 61

Fig. 2. The plasma cortisol levels of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin. The data appear as the mean  $\pm$  SEM (n = 12). Different letters denote that data are significantly different from the control at P < 0.05..... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AHR	Anti-radical hidroxil ( <i>anti-hydroxyl radical</i> )
ALT	Alanina transaminase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato transaminase
ASA	Anti-ânion superóxido ( <i>antisuperoxide anion</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAOs	Espécies ativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
NF-κβ	Fator nuclear-κβ
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos ( <i>lipid hydroperoxide</i> )
LOO·	Radical peroxil
LPO	Lipoperoxidação ( <i>lipid peroxidation</i> )
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NPSH	Tióis não proteicos ( <i>non-protein thiols</i> )
O·	Radical alcóxil
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH·	Radical hidroxil
OS	Estresse oxidativo ( <i>oxidative stress</i> )

PC	Proteína carbonila
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
RL	Radicais livres
ROI	Intermediários reativos de oxigênio ( <i>reactive oxygen intermediates</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio ( <i>reactive oxygen species</i> )
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Capacidade antioxidante total

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>1.1 <i>Rhamdia quelen</i></b> .....	17
<b>1.2 O balanço oxidativo</b> .....	19
1.2.1 Espécies reativas de oxigênio .....	19
1.2.2 Estresse oxidativo .....	21
1.2.3 Sistema de defesa antioxidante .....	23
<b>1.3 Flavonoides</b> .....	25
<b>1.4 Flavonoide Rutina</b> .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	30
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	30
<b>3 MANUSCRITO</b> .....	32
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## INTRODUÇÃO

A criação de peixes está comercialmente em crescimento no país, o sucesso e a alta produtividade dependem de vários fatores que vão desde as condições ambientais, manejo, até a suscetibilidade a doenças. Para a boa comercialização o produtor precisa de informações técnicas sobre a espécie a ser cultivada e treinamento adequado para alcançar a máxima produção de peixes, no tamanho necessário, em tempo reduzido e com o menor custo (ROSS; ROSS, 2008).

Dentre os peixes, o jundiá (*Rhamdia quelen*) apresenta grande potencial para piscicultura na Região Sul, por ser uma espécie que apresenta crescimento mesmo nas baixas temperaturas observadas no inverno no estado do Rio Grande do Sul, se reproduzindo em quase todos os meses do ano, com exceção dos meses mais frios (BARCELLOS et al., 2003). Assim como outras espécies de peixes, o jundiá em seu ambiente de cultivo encontra-se sujeito a constantes fatores inerentes a aquicultura, como manipulação, transporte, reprodução induzida, coleta de ovos e de esperma, baixa qualidade da água e alta densidade de estocagem, que levam ao estresse e que vão afetar o crescimento e a eficiência alimentar (BALDISEROTTO, 2009). Estes fatores também podem desencadear a situação de estresse oxidativo (OS, do inglês *oxidative stress*) e a predisposição a doenças, levando a perdas na produtividade.

A disponibilidade de oxigênio no ambiente aquático é um dos fatores a serem considerados, pois é fundamental para todos os organismos aeróbios, porém, pode levar a danos devido à formação das espécies ativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), geradas na redução do oxigênio. Este processo ocorre quando há um desequilíbrio entre a concentração de ROS e as defesas antioxidantes, acontece o OS podendo causar danos nos componentes celulares e em tecidos (LUSHCHACK; BAGNYUKOVA, 2006). Entretanto, existem distintas estratégias celulares de defesa contra os processos mediados pelas ROS que incluem defesas enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST) e as defesas não enzimáticas endógenas como a glutatona e exógenas tais como o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, flavonoides, entre outros (PAVANATO; LLESUY, 2008).

Estudos têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem diminuir o risco de diversas doenças (RODRIGUES et al., 2003). Segundo Costa e



colaboradores (2000), a alimentação exerce papel fundamental no equilíbrio metabólico e na manutenção da saúde. Com o desenvolvimento da piscicultura e da criação intensiva há um risco elevado do surgimento de doenças acarretando em perdas na produção e na qualidade do pescado. Dietas contendo compostos antioxidantes podem inibir o aparecimento de doenças causadas por microrganismos aquáticos oportunistas e aumentar a resistência nos peixes (HIRSCH et al., 2006).

Os efeitos benéficos de alguns alimentos estão associados à presença de flavonoides com ação antioxidante, que atuam como varredores de ROS. Devido a isso, há importância do estudo de agentes antioxidantes, relacionado à frequente associação entre danos teciduais e liberação de radicais livres (RL) (COSTA et al., 2000). Estes poderiam ser introduzidos na dieta do peixe através de materiais vegetais, no ambiente natural ou sob condições de aquicultura.

Na aquicultura, já foi demonstrado que a rutina aumenta a capacidade imunológica em camarões (*Litopenaeus vannamei*) infectados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* (HSIEH et al., 2008). Estudos com ratos, demonstram a eficaz atividade antioxidante (LA CASA et al., 2000; KHAN et al., 2012; YEH et al., 2014) e que a rutina não possui toxicidade quando adicionada na dieta (HASUMURA et al., 2004). Além da bem descrita atividade antioxidante, os flavonoides também possuem propriedades anti-inflamatórias, antienvelhecimento, anticancerígenas e antibacterianas (SOBERON et al., 2007).

Assim, tendo em vista os diversos efeitos já descritos para a rutina, este trabalho procurou avaliar a influência da adição da rutina na dieta sobre a resposta dos parâmetros sanguíneos e biomarcadores de OS no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com este flavonoide durante 21 dias. Considerando a inexistência de estudos associando a rutina na dieta de peixes, este trabalho poderá contribuir com informações relevantes sobre as vantagens de um produto natural associado à piscicultura com o intuito de proporcionar benefícios à produção, meio ambiente e bem-estar dos animais.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 *Rhamdia quelen*

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Figura 1), (família Heptapteridae, ordem Siluriformes), é uma das espécies nativas mais cultivadas na região sul (IBAMA, 2007), pois é bem adaptada a diferentes ambientes e de boa aceitação no mercado consumidor. Entretanto, segundo Baldisserotto (2009), essa espécie nativa que atingiu maior presença na piscicultura do estado do Rio Grande do Sul apresentou uma diminuição na sua produção nos últimos anos de 7,6% para 1,5% do total.



**Figura 1-** Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*.

Fonte: <http://www.fishbase.org>

A espécie apresenta distribuição neotropical e é amplamente distribuída do sudeste do México, a região central da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É um peixe de hábito noturno e se adapta em diferentes ambientes tendo como *habitat* natural lagos e poços fundos dos rios, preferindo águas mais calmas com fundo de areia e lama junto às margens e vegetação. Com corpo coberto de couro e a cor variando de marrom-avermelhado claro a cinza e a parte ventral mais clara, também pode ser encontrada em outras variações como o jundiá albino. A coloração do corpo varia de acordo com o ambiente em que se encontra, pois quando colocados em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe encontra-se em ambientes escuros (GOMES et al., 2000).

Possui hábito alimentar onívoro, sendo os itens alimentares mais frequentes os peixes como lambaris e guarús, crustáceos, insetos terrestres e aquáticos, detritos orgânicos e restos

vegetais, aumentando de intensidade no outono e no inverno (GOMES et al., 2000; SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006; GOMIERO et al., 2007).

O crescimento do jundiá é mais pronunciado nos primeiros anos de vida, com uma taxa de crescimento nos machos maior que a das fêmeas, porém após o terceiro/quarto ano de vida ocorre uma inversão, a fêmea passa a crescer mais rapidamente. A maturidade sexual é atingida após aproximadamente um ano de vida e seu período reprodutivo ocorre de agosto a março (GOMES et al., 2000).

Mesmo apresentando boa produtividade (quando criado em cativeiro) e uma boa aceitação no mercado consumidor, devido à sua carne saborosa e ausência de espinhos intramusculares (CARNEIRO; MIKOS, 2005), a produção do jundiá, assim como a de outras espécies, oferece alguns desafios, pois são enfrentados alguns problemas durante o cultivo (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2005).

O estresse dos peixes e as alterações nas condições ambientais são problemas comuns e difíceis de controlar, podem reduzir o desempenho e aumentar a susceptibilidade a doenças. O estresse pode ser gerado por vários fatores como, altas densidades de estocagem e até mesmo uma variação brusca da temperatura da água (SEGNER, 2012). Além disso, tais condições afetam o balanço dos pró-oxidantes/antioxidantes, desencadeando a situação de OS (MONSERRAT et al., 2007). Pelo contato íntimo entre os peixes e a água em que vivem, as condições ótimas de cultivo dependem principalmente das características químicas e físicas da água. Sendo assim, é extremamente necessário manter o controle adequado para um bom rendimento na criação (BALDISSEROTTO, 2009).

O desenvolvimento e crescimento dos peixes também são afetados por doenças oportunistas, problemas fisiológicos e por deficiências no sistema imunológico (BALDISSEROTTO, 2009; SANTOS et al., 2009). Entretanto, a associação de uma boa qualidade da água dos tanques de cultivo, manejo, densidade de estocagem e adequado teor nutricional da ração, garantirão o bem-estar dos peixes. Estratégias profiláticas com uso de aditivos naturais na dieta estão sendo testadas para otimização do desempenho das espécies (SANTOS et al., 2009). Estas estratégias podem beneficiar a piscicultura, principalmente nas fases iniciais do cultivo, quando os peixes estão mais susceptíveis a doenças (PORTZ, 2006).

Em um estudo realizado por Ndong e Fall (2007), três concentrações do extrato de alho (0, 0,5 e 1 %) foram adicionadas na dieta de *Oreochromis niloticus* e estes foram alimentados durante 28 dias. Observou-se uma melhora da resposta imune pelo aumento dos leucócitos, da atividade fagocitária e lisossômica dos peixes alimentados com a dieta

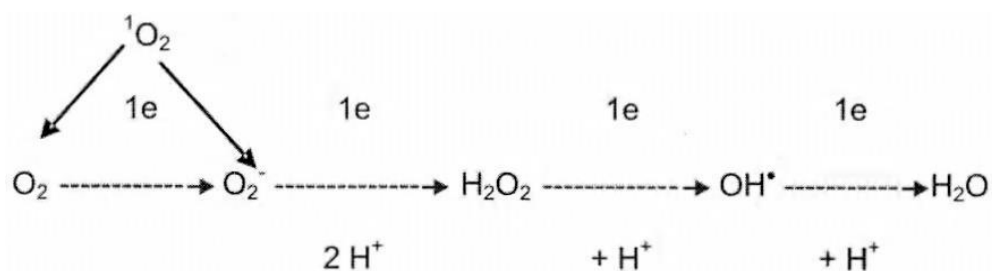
contendo 0,5 % do extrato de alho, quando comparados com o controle. Na maior concentração testada, não foi observado efeito imunoestimulante.

Do mesmo modo, a adição de isoleucina na dieta de *Cyprinus carpio* durante 60 dias melhorou a capacidade antioxidante, a resposta imunológica e apresentou resistência frente a bactéria *Aeromonas hydrophila* (ZHAO et al., 2013).

## 1.2 O balanço oxidativo

### 1.2.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é relativamente não reativo e não tóxico, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Porém, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos causando toxicidade. Os intermediários reativos de oxigênio (Figura 2), conhecidos como Reactive Oxygen Intermediates (ROI) ou Reactive Oxygen Species (ROS), ou ainda Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) são gerados através de reduções parciais do oxigênio formando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular produzindo o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (PAVANATO; LLESUY, 2008).



**Figura 2-** Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio.

Fonte: PAVANATO; LLESUY (2008).

O oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) é a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Tem importância em certos eventos

biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Seus alvos preferenciais em reações químicas são as duplas ligações como em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) ou guanina em bases de DNA (DIPLOCK et al., 1998).

O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é formado, continuamente, através de diversos processos celulares, incluindo os sistemas microsomal e mitocondrial de transporte de elétrons. Outras fontes dessa molécula são a xantina desidrogenase/oxidase e outras oxidases celulares. As células mielóides contêm um complexo de transferência de elétrons associado à membrana plasmática, a nicotinamida denina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que reduz o oxigênio com a NADPH produzindo o ânion superóxido. Esse radical é considerado uma espécie pouco reativa porque não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de produção, porém pode se combinar com outras espécies como o óxido nítrico, formando uma espécie mais reativa (FANG et al., 2002; THOMAS, 2003).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é gerado pelas mesmas fontes que produzem o  $O_2^{\cdot-}$ , pois tanto a destruição enzimática como a não enzimática deste produzem o  $H_2O_2$ . As enzimas peroxissomais associadas com o metabolismo de ácidos graxos e as enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares, também são responsáveis pela sua formação. O  $H_2O_2$  é considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (THOMAS, 2003).

O radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) é considerado a espécie mais reativa, pois é capaz de reagir com todas as biomoléculas produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. A vida média deste é muito curta, reagindo no seu próprio sítio de formação (DIPLOCK et al., 1998; THOMAS, 2003).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos derivados do metabolismo normal da célula, sendo as mitocôndrias consideradas como a maior fonte *in vivo* dessas espécies (CHANCE et al., 1979). Essas moléculas são consideradas ativas, pois não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas. Muitas dessas ROS são RL definidos por Halliwell e Gutteridge (2007), como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. Os RL são formados pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, por meio de reações “redox” ou de óxido-redução.

### 1.2.2 Estresse oxidativo

A célula, unidade da vida, é uma verdadeira usina de pró e antioxidantes. Quando ocorre uma situação na qual existe um aumento na concentração, em estado estacionário, das ROS acima de seus níveis fisiológicos, reconhece-se como OS, podendo levar a injúrias e até mesmo a morte celular (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005; PAVANATO; LLESUY, 2008). O OS é resultado de um dos três fatores: (1) aumento na geração das ROS, através da acumulação de intermediários reativos; (2) prejuízo do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos); (3) incapacidade para reparar o dano oxidativo (ALY et al., 2010).

A consequência do OS mais comumente descrita na literatura científica é a lipoperoxidação (LPO). A interação entre RL e lipídeos envolve reações em cadeia em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Essas etapas podem ser verificadas através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (etapa de terminação) e dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (etapa de propagação).

Além da LPO, podem ocorrer também danos as proteínas que apresentam muitos sítios reativos que podem ser danificados durante o OS. A formação de grupos carbonil, que se correlacionam diretamente com danos causados às proteínas, também pode ocorrer pelo aumento de ROS que atuam sobre grupos amino das proteínas, alterando sua estrutura e função. Este processo é irreversível e causa alterações conformacionais, diminuição da atividade catalítica de enzimas e, finalmente, resulta em degradação de proteínas por proteases, devido a maior suscetibilidade (ALMROTH et al., 2005). As ROS também podem induzir mitose e ocasionar danos ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Lushchak (2011), tem sido estabelecido que qualquer estresse geralmente é acompanhado de OS em animais aquáticos. Algumas condições ambientais como a temperatura da água, nível de oxigênio, salinidade e presença de íons de metais de transição são formas estressoras, quando em condições desfavoráveis aos animais aquáticos. Os resultados podem ser bastante prejudiciais às células podendo variar bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada (BERRA; MENCK, 2006).

Nos peixes existem várias situações que induzem ao OS (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005), podendo afetar a produtividade dos viveiros e a aquicultura. Dentre os organismos

aeróbicos, os peixes são muito suscetíveis ao ataque das ROS, principalmente porque seus tecidos são caracterizados por uma alta concentração de PUFA (LIN; SHIAU, 2007). Os PUFAS podem ser atacados pelas ROS, levando à perda da função celular, sendo por isso, muito significativas as medidas de LPO em peixes (STOREY, 1996).

Os peixes, assim como os demais seres aeróbicos, possuem defesa antioxidante para se protegerem dos danos causados pelas ROS (WILHELM FILHO, 2007). Entretanto, as defesas antioxidantes nos peixes dependem de vários fatores, como idade, comportamento alimentar, fatores nutricionais, fatores ambientais, infestações por parasitas, entre outros (MARTÍNEZ-ALVARÉZ et al., 2005).

Dentre estes fatores, o controle de uma dieta com as quantidades ideais de nutrientes é essencial para o crescimento, defesas imunológicas e a manutenção das funções vitais dos peixes, como respostas a estressores. Diversos estudos têm relacionado os níveis de vitaminas e aminoácidos na dieta de peixes com o *status* oxidativo nestes organismos (PUANGKAEW et al., 2005; VIJAYAVEL et al., 2006; FENG et al., 2012; FENG et al., 2014).

Em *Oncorhynchus mykiss* a suplementação com vitamina E (0, 100 ou 1000 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol/kg de dieta) protege contra o OS causado por altos níveis de ácidos graxos altamente insaturados n-3 (n-3 HUFA, do inglês *n-3 highly unsaturated fatty acids*) (20% ou 40% n-3 HUFA) na dieta. Os resultados mostraram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, correspondendo a um mecanismo fisiológico que combate a elevação dos RL sob situações de OS (PUANGKAEW et al., 2005). A dieta contendo vitaminas C e E (100 mg de ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) também foi eficiente na proteção contra o OS causado por exposição ao cobre (4,0, 2,5 e 1 mg/L) em *Terapon jarbua*, sendo verificada uma diminuição da LPO no encéfalo, brânquias, fígado, rim, músculo e baço (VIJAYAVEL et al., 2006).

Em *Cyprinus carpio* a suplementação da dieta com biotina (0,010, 0,028, 0,054, 0,151, 0,330, 1,540 e 2,680 mg de biotina/kg de dieta) por 63 dias, diminuiu os níveis de LPO e proteína carbonila (PC) (0,151 e 0,330 mg de biotina/kg de dieta), mostrou um aumento na capacidade anti-radical hidroxil (AHR, do inglês *anti-hydroxyl radical*) e anti-ânion superóxido (ASA, do inglês *antisuperoxide anion*) (0,054 e 1,540 mg de biotina/kg de dieta) no soro, intestino, hepatopâncreas e músculo. A atividade das enzimas antioxidantes, CAT, GPx, GST, GR e o conteúdo de GSH estavam aumentados nos tecidos e no soro em todas as dietas testadas, demonstrando que a biotina aumenta o *status* antioxidante desses peixes (FENG et al., 2014). Em outro estudo de Feng e colaboradores (2012), também com *C. carpio*, foi verificada a influência da dieta contendo altos níveis de histidina (2,3, 4,4, 6,3, 8,6,

10,8 e 12,7 g de histidina/kg de dieta). Os resultados também mostraram uma redução nos níveis de LPO e um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, GST e no conteúdo de GSH.

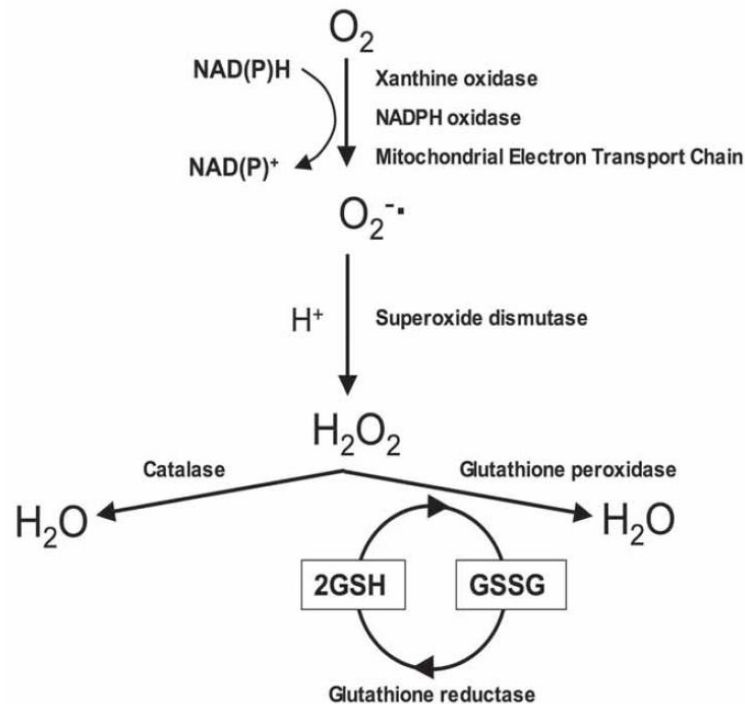
De acordo com estes estudos fica evidente que a adição de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta de peixes pode aumentar a capacidade de eliminação das ROS, inibindo a oxidação de lipídios, e estimular a atividade das enzimas antioxidantes e o conteúdo dos antioxidantes não enzimáticos, contribuindo para o aumento da resposta antioxidante nestes organismos.

### 1.2.3 Sistema de defesa antioxidante

A fim de atenuar as consequências da toxicidade causada pelo O<sub>2</sub>, os organismos aeróbicos desenvolveram o sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são a principal linha de defesa e correspondem a quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou mesmo impedem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A célula pode se proteger de duas maneiras: uma delas, atuando como detoxificadora do agente, impedindo a sua formação e, conseqüentemente, o ataque a lipídeos, proteínas e às bases do DNA; a outra, tem a função de reparar a lesão ocorrida. Esse processo está relacionado com a remoção dos danos da molécula de DNA e a reconstituição de membranas celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A eliminação das ROS é realizada por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

O mecanismo antioxidante enzimático envolve as enzimas que fazem a proteção primária e intrínseca do organismo (Figura 3). Estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Através da ação destas enzimas, o organismo mantém a concentração das ROS dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005).





**Figura 3-** Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de AITKEN; ROMAN, 2008.

A SOD, importante defesa antioxidante, está presente tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD) e participa da reação de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ . A CAT, encontrada principalmente nos peroxissomos, promove a degradação do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e água e, desta forma, diminui o risco da formação de  $OH^{\bullet}$ , um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos, uma vez que pode atravessar membranas celulares e reagir com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GPx catalisa a redução dos peróxidos inorgânicos e orgânicos, que são efetivos formadores de ROS, com a oxidação de um doador de hidrogênio. Utiliza a glutathione reduzida (GSH) como co-fator, formando a glutathione oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, é reduzida pela ação da enzima GR, utilizando o NADPH como doador de elétrons (SIES, 1997). A GST catalisa reações de conjugação entre GSH e moléculas oxidadas. Atua na remoção dos xenobióticos e produtos de LPO, transformando o composto tóxico em uma forma facilmente excretável (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

Os antioxidantes endógenos e exógenos atuam sinergicamente compondo um sistema antioxidante que inclui as enzimas citadas anteriormente e também substâncias não enzimáticas (NIJVELDT et al., 2001).

O sistema de defesa não enzimático corresponde a moléculas que protegem os alvos biológicos da oxidação, sendo moléculas do próprio organismo, exógenas, sintéticas ou naturais. Esse sistema vai atuar na supressão da formação de RL, por quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras destes radicais, e na eliminação ou desativação dos radicais (RIBEIRO et al., 2005). O principal antioxidante não enzimático endógeno é a glutathiona (GSH), entre os exógenos estão o  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico (AA), flavonoides, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GSH é considerada o principal antioxidante intracelular, por que está presente em todas as formas de vida e é rapidamente oxidado em condições nas quais ocorre um aumento na produção celular de ROS. Sua capacidade antioxidante é devida ao grupo sulfidríla do aminoácido cisteína, que se oxida facilmente, atuando como um redutor celular (OHARA, 2006).

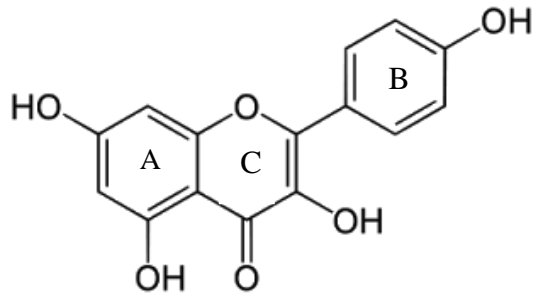
O  $\alpha$ -tocoferol confere proteção à membrana celular por agir como um quelante dos oxidantes produzidos durante a LPO. Atua como sequestrador do  $\text{LOO}\cdot$  protegendo os ácidos graxos insaturados dentro dos fosfolípídios das membranas e nas lipoproteínas plasmáticas. Entre os carotenoides, destaca-se o  $\beta$ -caroteno que é o mais importante e mais ativo. É considerado um potente antioxidante originado das plantas, sendo que as ROS mais eficientemente neutralizadas por ele são o  $^1\text{O}_2$  e o  $\text{LOO}\cdot$  (FANG et al., 2002; ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2003). Já o AA, por ser hidrofílico, pode neutralizar diretamente as ROS, devido a sua propriedade de doador de elétron (RIBEIRO et al., 2005).

Os flavonoides contêm vários grupos hidroxil ligados a anéis aromáticos. Eles se caracterizam como sendo potenciais agentes redutores e sua capacidade antioxidante está envolvida com o número e o padrão de disposição desses grupamentos hidroxil (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

### 1.3 Flavonoides

As propriedades terapêuticas das plantas têm despertado interesse crescente, e por esta razão, vários componentes bioativos dos vegetais têm sido isolados e caracterizados. Dentre estes componentes naturais, encontram-se os flavonoides (WOOD et al., 1999; VAN DER WATT et al., 2001). Os flavonoides são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células vegetais e que representam o maior grupo de compostos fenólicos naturais. Possui 15

átomos de carbono em seu núcleo fundamental que consistem de um esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6), caracterizados por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 4). A sua capacidade antioxidante é determinada pela estrutura, em particular por hidroxilas, que podem doar elétrons.



**Figura 4-** Estrutura química dos flavonoides

Adaptado de: GRANGEIRO et al., 2009.

Essas moléculas têm demonstrado propriedade antioxidante, capazes de proteger tecidos contra danos oxidativos devido à propriedade de inativar uma grande variedade de ROS e outras espécies reativas como aquelas derivadas do nitrogênio (ERNs) (RICE-EVANS et al., 1997; HEIM et al., 2002; WOJDYLO et al., 2007).

Subdividem-se em 13 subclasses, com mais de 7000 compostos descritos (LILAMAND et al., 2014), de acordo com sua estrutura molecular. As principais subclasses dos flavonoides são: antocianidina (cianidina), flavanol (catequinas, epicatequinas, procianidina), flavanonas (naringina, hesperidina), flavona (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonol (quercetina, miricetina, rutina) e isoflavona (genisteína, daizeína) (BRAVO, 1998).

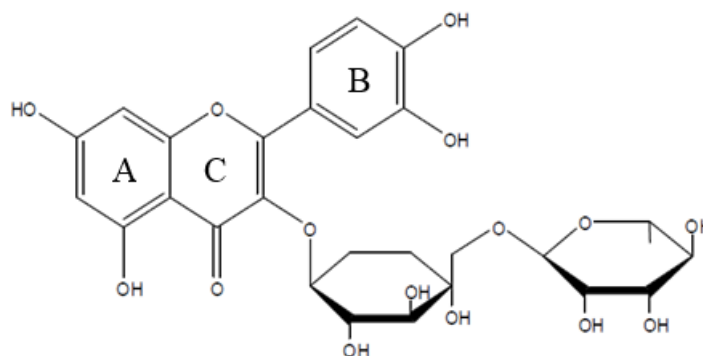
Os flavonoides são encontrados na maçã, feijão, cebola, couve, vagem, tomate, cereja, brócolis, batata, laranja, melão, pera, uva, bem como no chá preto, vinho tinto, na cerveja e nos sucos de laranja, maçã, limão e também em grãos, nozes, sementes e especiarias (GOLDBERG et al., 1995; PLUMB et al., 1999; NIJVELDT et al., 2001).

Apesar da crescente evidência do potencial antioxidante *in vitro* dos flavonoides, pouco se sabe sobre a sua eficácia *in vivo* (PIETTA, 2000). Os peixes são frequentemente expostos a fatores estressores no seu cultivo, e a sua sensibilidade pode ser reduzida por meio de suplementação com antioxidantes. Dietas de alta qualidade, com teor nutricional adequado, diminuem a incidência de doenças e garantem o desempenho produtivo dos peixes (SANTOS et al., 2009).

Existem estudos onde os flavonoides estão sendo utilizados em formulações de dietas para peixes para controlar a diferenciação sexual (DABROWSKI; LEE, 2001; RODRIGUEZ et al., 2004; TZCHORI et al., 2004), a fim de obter uma população de maior valor no mercado. O estudo realizado por Awad et al. (2013), demonstrou um aumento na atividade de lisozima, proteína total, atividade antiprotease e atividade bactericida frente a bactéria *Aeromonas hydrophila* no plasma de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após suplementação da dieta com diferentes concentrações do flavonoide quercetina, sugerindo assim, ser um eficaz imunostimulante.

#### 1.4 Flavonoide Rutina

Entre os flavonoides, a rutina que é um bioflavonoide pertencente a subclasse dos flavonóis tem sido amplamente estudada. A rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,5,7,3',4' pentahidroxi flavona) (Figura 5), é uma substância de cor amarelada, encontrada em frutas especialmente as cítricas como laranja, limão, toranja e lima (JANBAZ et al., 2002). Outras fontes alimentares incluem a cebola, trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench, *F. tataricum* (L.) Gaertn., Polygonaceae), uva, e também bebidas como o vinho tinto (HOLLMAN et al., 1996; THOMSON et al., 1999). No Brasil, uma fonte importante do flavonoide rutina são os frutos da planta *Dimorphandra mollis* Benth também conhecida como Fava-d'anta, uma espécie arbórea, com 8-14 metros de altura, encontrada em várias regiões do Brasil (ALMEIDA, 1998; LORENZI, 2002).



**Figura 5-** Estrutura química do flavonoide rutina

Adaptado de: MEYERS et al., 2008.

É o glicosídeo mais comum derivado da quercetina, da qual se diferencia por possuir uma molécula de açúcar (rutinose) na posição 3 do anel C, é bem conhecida e amplamente estudada por apresentar múltiplas atividades farmacológicas, dentre elas a atividade antioxidante (CHUA, 2013).

A atividade antioxidante da rutina tem uma ação terapêutica em patologias que envolvem RL, podendo inibir o processo de formação do mesmo em vários estágios, por reagirem com o  $O_2^{\cdot-}$  e  $LOO^{\cdot}$ , e por formarem um complexo com o ferro, que é um catalisador da formação de ROS (PATHAK, 1991; YOKOZAWA et al., 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que a rutina é um eficaz agente antioxidante (RUSSO et al., 2000; SHENBAGAM; NALINI, 2010; KERDUDO et al., 2014). Funabiki e colaboradores (1999), verificaram uma diminuição de PC no plasma de ratos alimentados com a dieta contendo 2,5 % de rutina por 18 dias. Gao e colaboradores (2002), também suplementaram a dieta de ratos com rutina 0,75 g/kg ou 2,25 g/kg e alimentaram durante 30 dias, onde evidenciaram um aumento da SOD no fígado.

Outras atividades biológicas atribuídas a rutina são a normalização da resistência e da permeabilidade das paredes dos vasos capilares, principalmente quando associada à vitamina C (PATHAK et al., 1991), atividades anticarcinogênica (WEBSTER et al., 1996), citoprotetora (JANBAZ et al., 2002), antiplaquetária (SHEU et al., 2004), anti-diabetes (HAO et al., 2012), cardioprotetora (ANNAPURNA et al., 2009), neuroprotetora (GULPINAR et al., 2009), bem como a atividade anti-inflamatória (PAN et al., 2014). Estudos demonstram que os RL ativam o fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de transformação do crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (LIU et al., 2001). Assim, a atividade anti-inflamatória da rutina pode ser atribuída ao seu efeito antioxidante, neutralizando os RL e, desta forma, inibindo o NF- $\kappa\beta$  e a expressão de IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ 1 (GAO et al., 2013; LEE et al., 2013; PAN et al., 2014).

Um estudo avaliou o efeito hepatoprotetor da dieta líquida com o extrato etanólico de *Fagopyrum tataricum*, e de seus principais constituintes ativos (rutina e quercetina) frente ao dano induzido por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) em ratos. Os resultados demonstram que o extrato e os flavonoides inibiram o aumento das enzimas aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) no soro. Também mostrou um aumento da atividade das enzimas CAT, SOD, GPx, GR e diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e interleucina-6 (IL-6) nos animais tratados. Portanto, tanto o extrato da planta, quanto a rutina e a quercetina possuem efeito hepatoprotetor frente a

esse dano, relacionado com o seu efeito “*scavenger*” de RL, porém, nesta pesquisa a rutina atuou de maneira mais satisfatória (LEE et al., 2013).

Assim, o presente estudo, utilizando a suplementação com rutina na ração de jundiás, se baseia nas vantagens que ela proporciona em outras espécies animais (FUNABIKI et al., 1999; GAO et al., 2002) quanto à redução do estresse, combate aos RL e aumento da resposta fisiológica. Considerando a busca pelo estabelecimento do bem-estar animal, a importância da substituição de produtos sintéticos por produtos naturais no cultivo de animais e aos vários efeitos já descritos para a rutina, este estudo mostra-se de ampla relevância. Além disso, estudos relativos à rutina na dieta de peixes e os biomarcadores de OS ainda não estão descritos na literatura científica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da dieta contendo diferentes concentrações de rutina sobre os parâmetros sanguíneos e biomarcadores de OS em jundiás (*R. quelen*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração dos compostos fenólicos na dieta;
- Avaliar a hemoglobina e hematócrito no sangue total;
- Avaliar a glicose, lactato desidrogenase, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, ureia e cortisol no plasma;
- Determinar os níveis de LPO através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de rutina;
- Analisar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de rutina;
- Avaliar o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (medida indireta de GSH) e conteúdo de ácido ascórbico (AA) no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de rutina;

- Avaliar a capacidade antioxidante total (TRAP) no encéfalo, brânquias, fígado, rim e músculo de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de rutina.



### **3 MANUSCRITO**

O manuscrito está disposto conforme as especificações requisitadas pela revista FOOD CHEMISTRY, ao qual foi submetido para publicação.

**Effect of diets enriched with rutin on blood parameters and oxidative biomarkers in silver catfish (*Rhamdia quelen*)**

Tanise S. Pês <sup>a</sup>, Etiane M.H. Saccol <sup>a</sup>, Giovana M. Ourique <sup>a</sup>, Érika P. Londero <sup>a</sup>, Luciane T. Gressler <sup>a</sup>, Isabela A. Finamor <sup>a</sup>, Daniel A. Rotili <sup>b</sup>, Susana F. Llesuy <sup>c</sup>, João Radünz Neto <sup>b</sup>, Bernardo Baldisserotto <sup>a</sup>, Maria A. Pavanato <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil*

<sup>b</sup> *Department of Zootechny Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil*

<sup>c</sup> *Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires 1113, Argentina*

**ABSTRACT**

The effects of adding rutin to the diet (0, 0.15 or 0.30%) of silver catfish for 21 days on blood parameters and oxidative stress biomarkers were investigated. Fish that received the diet containing 0.15% rutin exhibited reduced plasma cortisol levels. The levels of lipid peroxidation (LPO) were lowered in the all tissues of animals receiving the diet containing rutin. Rutin increased the activity of the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), non-protein thiols (NPSH), ascorbic acid content (AA) and total reactive antioxidant potential (TRAP) in the brain; glutathione S-transferase (GST) activity and TRAP in the gills; SOD, CAT and GST activity, NPSH, AA levels and TRAP in the liver; CAT and GST activity and

TRAP levels in the kidneys; and glutathione peroxidase (GPx) activity, NPSH, AA levels and TRAP in the muscle. The supplementation of rutin to the diet of fish is beneficial because it increases the antioxidant responses of tissues.

**Keywords:** Fish; Flavonoid; Antioxidant defenses; Oxidative stress.

\* Corresponding author: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1000, Avenida Roraima, Camobi 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Tel./fax: + 55 55 3220 9381.

*E-mail address:* [amaliapavanato@yahoo.com.br](mailto:amaliapavanato@yahoo.com.br) (M.A. Pavanato).

## 1. Introduction

The success and high productivity of fish farming depend on several factors, including environmental conditions, handling and disease susceptibility. The major targets in the aquaculture industry are to maintain fish health as well as to improve fish performance. Studies show that substances derived from plants may serve as functional dietary supplements in commercial fish (Zheng, Tan, Liu, Zhou, Xiang & Wang, 2009).

The silver catfish (*Rhamdia quelen*) has great potential for fish farming in the South of Brazil; it is a species with rapid growth rates in low temperatures and reproduces almost every month of the year. Like other species in aquaculture environments, the silver catfish is subject to constant factors inherent to aquaculture such as handling, transport, induced spawning, egg and sperm collection, poor water quality and high stocking density, which lead to stress and could affect the growth and feed efficiency (Barcellos, Kreutz, Rodrigues, Fioreze, Quevedo & Cericato, 2003). These factors can also trigger oxidative stress (OS) and a predisposition to diseases, thus leading to yield losses. When an imbalance between the concentration of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses occurs, OS may cause damage to the

cellular components and tissues. However, there are distinct cellular defense strategies against ROS-mediated processes that include enzymatic defenses such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST), among other non-enzymatic defenses such as glutathione, ascorbic acid (vitamin C),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), carotenoids and flavonoids (Lushchack & Bagnyukova, 2006).

Diets containing antioxidant compounds may inhibit the onset of various diseases and enhance the resistance of fish. This is important because the development of intensive livestock farming elevates the risk of disease caused by opportunistic microorganisms in the water, thus, resulting in losses in production and the quality of the fish (Hirsch, Pereira-Júnior, Logato, Piccoli, & Figueiredo, 2006). Studies with the addition of natural antioxidants of vegetable origin in the diet of fish have been conducted to improve the growth performance, antioxidant activity (Zheng et al., 2009), storage and delay deterioration of meat (Álvarez, García, Jordan, Conesa & Hernández, 2012).

Rutin (quercetin-3-rutinoside) belongs to a group of natural substances with variable phenolic structures and is found in many plants, particularly *Fagopyrum esculentum* Moench and *F. tataricum* (L.) Gaertn., which are species of the Polygonaceae (buckwheat) family (Kim, Lee, Kim, Park, Kwon & Lee, 2005). It has been demonstrated in various animal models that rutin has antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, antiviral, and anticancer properties (Aron & Kennedy, 2008). Rutin acts as a scavenger of ROS by donating hydrogen atoms to peroxy radicals, superoxide ( $O_2^{\cdot -}$ ), singlet oxygen and hydroxyl radicals (OH $\cdot$ ); it also acts as a terminator and chelating agent of metal ions that are able to oxidize lipid peroxidation (LPO) (Afanas'ev, Dorozhko, Brodski, Kostyuk & Potapovitch, 1989). According to the study of Afanas'ev et al. (1989) who investigated the antioxidant activity of

rutin, this flavonoid has a therapeutic effect in diseases involving free radicals and is not toxic.

Thus, considering that the use of natural antioxidants such as rutin can be an alternative to improve animal welfare, this study aimed to investigate the effects of adding this flavonoid to the diet of silver catfish on the blood parameters and oxidative stress biomarkers in different tissues.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Fish and culture conditions*

The experiments were conducted in a recirculating aquaculture system in the Fish Physiology Laboratory at the Federal University of Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Silver catfish ( $244.05 \pm 1.62$  g,  $27.36 \pm 0.37$  cm) were obtained from a fish culture sector of UFSM. The animals were randomly distributed in nine plastic boxes (40 L), four fish per box, and acclimated to the laboratory conditions for two weeks. Water parameters were checked daily (temperature, total ammonia, nitrite and dissolved oxygen) or weekly (alkalinity, total hardness and pH). The experimental protocol was approved by the Committee on Animal Experimentation of UFSM under registration n° (077/2013).

### *2.2. Chemicals*

Rutin ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ) was obtained from the Sichuan Yabao Guangtai Pharmaceutical Co., Ltd. (Chengdu, Sichuan Province, China). All of the other reagent-grade chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA).

### *2.3. Diets and experimental design*

Three diets were formulated based on the study of Lazzari et al. (2008). All ingredients were finely ground, weighed and mixed by kneading until obtaining a homogeneous mixture. The different concentrations of rutin (0, 0.15 and 0.30 % rutin) were

added to the mixture together with rice bran (Table 1). Water was then added to the diets, and a drying process was performed in a forced air circulation oven for 24 h (55 °C). Lastly, the pellets were broken, sieved and stored in a freezer until use. The fish received the experimental diets until apparent satiation once a day (9 h) for 21 days. The experimental design resulted in three groups (performed in triplicate).

#### *2.4. Determination of total phenolic compounds in the diets*

The total phenolic compounds were determined in the diets according to the Folin-Ciocalteu procedure (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventó's, 1999). The absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm. Gallic acid was used as a standard, and the results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE) per 100 g of diet. The reaction was conducted in triplicate.

#### *2.5. Sample collection and chemical analysis*

After 21 days, blood samples were collected from the fish and biochemical analyses were performed. The blood sampling was performed from the caudal vein with heparinized sterile syringes. The fish were then euthanized by sectioning the spinal cord and brain, and the gills, liver, kidneys and muscle were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissues were stored at -80 °C for further analysis.

#### *2.6. Blood analysis*

The blood was utilized for different analyses. The plasma cortisol levels were quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Diagnostics Biochem Canada Inc., Canada). The samples were measured in duplicate, and the absorbance was determined in a spectrophotometer at 450 nm. The inter- and intra-assay variation coefficients were  $5.15 \pm 0.53$  % and  $4.13 \pm 0.67$  %, respectively. The results are presented as ng/mL. One aliquot of whole blood was subsequently transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min (Centrifuge 5804 R) for the determination of hematocrit using

microhematocrit methods. The hemoglobin concentration was obtained using the Drabkin reagent (Kamper & Zijlstra, 1964), read spectrophotometrically at 540 nm and expressed as g/dL blood. The mean cell hemoglobin concentration (MCHC) was calculated using the equation  $[\text{Hb}] \times 100 / \text{Hct}$  and expressed as g/dL. The levels of glucose (GLU), lactate dehydrogenase (LDH), triglycerides (TRI), cholesterol (CHO), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL) and urea (URE) in the plasma were determined using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) and expressed as mg/dL.

### *2.7. Protein measurement*

The protein content was measured using the method of Lowry, Rosebrough, Farra and Randall (1951) at 625 nm. Bovine serum albumin was used as a standard. The results are reported as mg/mL.

### *2.8. Oxidative damage measurements*

For the measurement of the OS biomarkers, each tissue was homogenized as described by Azambuja et al. (2011). The LPO levels were estimated using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay (Buege & Aust, 1978) at 535 nm. The results are reported as nmol/mg protein. The LPO levels were also measured by determining the lipid hydroperoxides (LOOH) using the method of Södergren, Nourooz-Zadeh, Berglund and Vessby (1998). The readings were performed using a spectrophotometer at 560 nm; the results are reported as nmol/mg protein.

### *2.9. Antioxidant enzyme activities*

The total SOD activity, expressed as SOD units/mg protein, was based on the inhibition rate of autocatalytic adenochrome generation at 480 nm (Misra & Fridovich, 1972). The CAT activity was evaluated by following the decrease in the 240 nm absorption of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and was reported as  $\mu\text{mol/mg}$  protein (Boveris & Chance, 1973).

The GPx activity was measured by following the NADPH oxidation at 340 nm, as described by Flohé and Gunzler (1984), and the results are expressed as nmol/min/mg protein. The GST activity, expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, was measured by the rate of dinitrophenyl-S-glutathione formation at 340 nm (Habig, Pabst & Jakoby, 1974).

#### *2.10. Non-enzymatic antioxidant measurements*

The non-protein thiols (NPSH) content, an indirect measure of GSH, was evaluated at 412 nm after reacting with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Proteins were eliminated through the addition of 0.5 M perchloric acid (Ellman, 1959). The NPSH content is reported in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein. The ascorbic acid (AA) was measured according to the method of Roe and Kuether (1942). The assay mixture containing the homogenate was treated with charcoal, filtered using 10 % thiourea and 2 % DNPH and incubated at 37 °C for 3 h. Following this, color was produced by adding 85 % sulfuric acid, and the absorbance was read at 540 nm. The standard curve was prepared by using different concentrations of ascorbic acid, and the slope was used to express the amount of ascorbic acid as nmol/mg protein.

#### *2.11. Total reactive antioxidant potential*

The total reactive antioxidant potential (TRAP) was determined by a chemiluminescence assay with 2,2'-azobis (2-aminodipropene) dihydrochloride and luminol, with the results expressed as  $\mu\text{mol}$  trolox/mg protein (Evelson, Travacio, Repetto, Escobar, Llesuy & Lissi, 2001).

#### *2.12. Statistical analysis*

The results were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Tukey test. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using Statistica Software (StatSoft, Inc.), version 7.0. The results are presented as the mean  $\pm$  standard error (SEM).



### 3. Results

#### 3.1 Water quality parameters

The water quality parameters remained stable throughout the experimental period. The temperature was maintained at  $22.05 \pm 0.06$  °C, the pH at  $7.41 \pm 0.03$  and the dissolved oxygen at  $6.84 \pm 0.14$  mg/L. The mean of the other parameters were as follows: hardness ( $21.6 \pm 1.2$  mg/L CaCO<sub>3</sub>), alkalinity ( $23.4 \pm 1.2$  mg/L CaCO<sub>3</sub>), nitrite ( $0.91 \pm 0.09$  mg/L), total ammonia ( $2.61 \pm 0.3$  mg/L) and non-ionized ammonia ( $0.06 \pm 0.006$  mg/L).

#### 3.2. Determination of total phenolic compounds

The samples displayed different concentrations of phenolic compounds (Fig. 2), which were 40 % and 21 % higher on 0.15 % and 0.30 % dietary rutin, respectively, when compared to the control ( $P < 0.05$ ).

#### 3.3. Blood analysis

The plasma cortisol levels were 34 % lower in the fish fed diets containing 0.15 % rutin when compared to the control animals (Fig. 1). The diets containing the rutin concentrations did not exert any significant effect on the HCT, HGB and MCHC in whole blood. Compared with the control, the plasma levels of GLU, LDH, TRI, CHO, LDL, HDL and URE did not differ among the experimental groups (Table 2).

#### 3.4. Biomarkers of oxidative stress in the brain

The protein contents did not differ among the experimental groups. The LPO levels, determined from the TBARS in the brain, were 40 % and 43 % lower in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, respectively, than in the control; this was also true for the LOOH measurements, which were 54 % and 62 % lower in the silver catfish fed with 0.15 and 0.30 % rutin, respectively. The SOD activity was 145 and 103 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The CAT activity was 38 % higher in the fish receiving 0.15 % rutin than in the control. The non-enzymatic antioxidant measurements

determined from the NPSH content was 15 and 13 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The content of AA was 101 % higher in the fish receiving 0.15 % rutin than in the control. The TRAP was 97 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control. By contrast, the GPx and GST activity did not differ among the various experimental groups (Table 3).

### *3.5. Biomarkers of oxidative stress in the gills*

The protein contents did not differ among the experimental groups. The LPO levels, determined from the TBARS in the gills, were 19 and 25 % lower in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, respectively, than in the control; this was also true for the LOOH measurements, which were 57 % and 32 % lower in the silver catfish fed with 0.15 and 0.30 % rutin, respectively. The GST activity was 175 and 58 % higher in the silver catfish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The TRAP was 138 % higher in the fish receiving 0.30 % rutin than in the control. By contrast, the SOD, CAT, and GPx activity and the NPSH and AA content did not differ among the experimental groups (Table 3).

### *3.6. Biomarkers of oxidative stress in the liver*

The protein contents did not differ among the experimental groups. The LPO levels, determined from the TBARS in the liver, were 36 and 32 % lower in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, respectively, than in the control; this was also true for the LOOH measurements, which were 42 % and 26 % lower in the silver catfish fed with 0.15 and 0.30 % rutin, respectively. The SOD activity was 139 and 172 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The CAT activity was 99 % higher in the fish receiving 0.15 % rutin than in the control. The GST activity was 100 % higher in the silver catfish receiving 0.15 % rutin than in the control. The non-enzymatic antioxidant measurements determined from the NPSH content was 14 % higher in the fish receiving 0.15

and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The AA content was 100 % and 88 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The TRAP was 65 and 59 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. By contrast, the GPx activity did not differ among the various experimental groups (Table 3).

### *3.7. Biomarkers of oxidative stress in the kidneys*

The LPO levels, determined from the LOOH in the kidneys, were 42 % and 52 % lower in fish fed diets containing 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. The CAT activity was 42 % higher in the fish receiving 0.15 % rutin than in the control. The GST activity was 100 % higher in the fish receiving 0.15 % rutin than in the control. There was also a significant increase (86 %) in comparison with the diet of 0.30 % rutin. The TRAP was 75 and 65 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in the control, respectively. By contrast, the TBARS levels, the GPx activity, and the NPSH and AA content did not differ among the various experimental groups (Table 4).

### *3.8. Biomarkers of oxidative stress in the muscle*

The protein contents did not differ among the experimental groups. The LPO levels, determined from the TBARS in the muscle, were 30 and 22 % lower in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, respectively, than in the control; this was also true for the LOOH measurements, which were 35 % and 54 % lower in the silver catfish fed with 0.15 and 0.30 % rutin, respectively. The GPx activity was 113 and 81 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, respectively, than in the control. The non-enzymatic antioxidant level determined from the NPSH content was 38 % higher in the fish receiving 0.30 % rutin than in the control. The AA content was 179 % higher in the fish receiving 0.30 % rutin than in the control. The TRAP was 87 and 90 % higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin than in

the control, respectively. By contrast, the SOD and GST activity did not differ among the various experimental groups (Table 4).

#### **4. Discussion**

Recent studies have demonstrated that the addition of antioxidants to the diets of fish of commercial interest can significantly increase productivity and improve fish health (Kütter, Romano, Ventura-Lima, Tesser & Monserrat, 2014; Li et al., 2014). Rutin is a flavonol glycoside composed of flavonol quercetin and disaccharide rutinose. It has been demonstrated to limit LPO as well as to scavenge superoxide radicals. In addition, it can also chelate metal ions such as ferrous cations that generate ROS (Cos, Ying & Calomme, 1998). The antioxidant properties of flavonoids have been attributed to the presence of phenolic compounds, which act as radical scavengers and occasionally as metal chelators (Hotta, Nagano, Ueda, Tsujino, Koyama & Osakai, 2002). However, little is known about the antioxidant effects of natural phenolic compounds in fish, and no studies have yet established the relationship of dietary fish rutin as an antioxidant. Our results showed that diets containing rutin presented high levels of phenolic compounds. In this study, we demonstrated that rutin showed positive effects by an improved response to antioxidants in the tissues of silver catfish, which may be attributed to the high content of phenolic compounds observed in the diets containing rutin.

In the plasma cortisol levels, there was a decrease in fish fed diets containing 0.15% rutin compared with the control. Several reports in the scientific literature have described observations of differing cortisol responses among fish of different species (Adamante, Nuñez, Barcellos, Soso & Finco, 2008; Fagundes & Urbinati, 2008). The blood parameters (HCT, HGB and MCHC in whole blood and plasma levels of GLU, LDH, TRI, CHO, LDL,

HDL and URE) were not influenced by diets containing rutin compared with the control, which demonstrates that the use of diets containing rutin for 21 days is not harmful to the fish.

The brain is particularly vulnerable to oxidative damage due to its high oxygen consumption, high content of polyunsaturated fatty acids, and the presence of transition metals as Fe and Cu, which can lead to ROS formation via the Fenton reaction (Mieiro, Pereira, Duarte & Pacheco, 2011). The addition of rutin to the silver catfish's diet caused a reduction in the LPO levels in the brain, as measured by the TBARS and LOOH levels. Menezes et al. (2014) demonstrated that the addition of 3.0 mg/kg of diphenyl diselenide in the diet of *Cyprinus carpio* during 60 days also reduced the TBARS in the brain. Similar to other animals, fish have antioxidant defense mechanisms that help to maintain their health and prevent oxidation lesions. The CAT and SOD are important antioxidant enzymes (Halliwell & Guttridge, 1999; Tocher et al., 2002). The SOD exhibited higher activity in the brain of silver catfish fed with 0.15 and 0.30 % rutin compared with the control. The CAT activity was higher in the brain of silver catfish fed with 0.15 % rutin compared with the control. The CAT and SOD are scavengers of ROS and act on  $H_2O_2$  and  $O_2^-$ , respectively (Tocher et al., 2002).

Moreover, the NPSH content, as an indirect measure of GSH, was also higher in the brain of silver catfish fed with any of the diets supplemented with rutin than those fed with the control diet. GSH, an important non-enzymatic antioxidant that plays a central role in second line antioxidant defenses, can reduce ROS and is a substrate for GPx and GST activities (Elia et al., 2011). AA has several functions in the central nervous system, including its action as an important antioxidant that is able to scavenge oxygen and nitrogen radical species (Harrisson & May, 2009). The AA content was higher in the brain of silver catfish fed with 0.15 % rutin compared with the control. Furthermore, the TRAP was higher in the brain of fish fed with any of the diets supplemented with rutin than those fed with the control diet. This type of defense includes a variety of compounds bearing different reactive centers

(phenols, thiols) with widely different hydrophobicities that allow the trapping of both hydrophobic and hydrophilic radicals. In this regard, there is great interest in the evaluation of the TRAP (Evelson et al., 2001).

The gills of fish are a multifunctional organ and perform vital functions such as respiration, osmoregulation, acid-base balance, and nitrogenous waste excretion (Evans, Piermarini & Choe, 2005). The addition of rutin to the silver catfish's diet caused a reduction in the LPO levels and increased the GST activity and TRAP (only diet 0.30 %). The LPO levels may be decreased because of the ability of rutin to scavenge free radicals, regulate endogenous antioxidants status, chelate metal catalysts and maintain a pro-oxidant/antioxidant balance, which subsequently decreases the attack of free radicals on the membrane lipids and attenuates tissue damage by preventing the propagation of LPO. Monserrat et al. (2014) demonstrated that the addition of 6000 mg/kg of lipoic acid in the diet (fed over 8 days) also resulted in decreased LPO levels and GST activity in the gills of *Jenynsia multidentata*.

The liver is the main organ of various key metabolic pathways and the most frequently studied tissue regarding OS. The addition of rutin to the silver catfish's diet caused a reduction in LPO levels and an increase in the SOD activity in the liver. The CAT activity was higher in the liver of silver catfish fed with 0.15 % rutin. The enhanced activity of SOD and CAT in the liver in response to rutin supplementation may be responsible for the decrease in hepatic LPO levels. SOD is considered as the first line of defense against the deleterious effects of oxygen radicals in the cells and it scavenges ROS by catalyzing the dismutation of superoxide to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT acts as a preventive antioxidant and plays an important role against the harmful effects of LPO. Thus, an increase in these enzymes can prevent the damage caused by ROS. These data are in agreement with those reported by Elia, Prearo, Pacini, Dörr, and Abete (2011) that supplemented the diet of *Cyprinus carpio* with 1.0 mg/kg selenium during 8 weeks and with Li et al. (2014), who also reported that LPO levels were reduced

with the addition of 25, 50, 100, 200 and 400 mg/kg of vitamin E in the diet of *Ctenopharyngodon idellus* during 8 weeks. The GST activity was higher in the silver catfish receiving diets containing 0.15 % rutin than in the control. These findings are in agreement with those of Monserrat et al. (2014).

The levels of the non-enzymatic antioxidants (NPSH and AA) were higher in the liver of silver catfish receiving diets containing rutin than those fed with the control diet. Elia et al. (2011) also reported increases in NPSH content. Moreover, Menezes et al. (2013) reported that the addition of 3.0 mg/kg diphenyl diselenide in the diet of *Cyprinus carpio* during 60 days also increased the levels of NPSH and AA in the liver. The TRAP was higher in the fish receiving the two concentrations of rutin compared with the control.

The kidneys play a vital role in the maintenance of an organism's internal environment and are key to the extracellular fluid volume, composition and acid-base balance regulation, presenting an additional function related to hematopoiesis (Oliveira Pacheco & Santos, 2008). In the kidneys, the LPO levels, determined from the LOOH, were reduced by rutin supplementation. The CAT and GST activity was higher in the fish receiving 0.15 % rutin; the GST activity was also higher in the fish fed with the diet of 0.30 % rutin. Zhao et al. (2013) also demonstrated decreased in LPO measured of TBARS in the kidneys of *Cyprinus carpio* fed diet containing 7.0, 9.5, 11.9, 13.9 and 16.9 g/kg isoleucine for 60 days; and increased activities of CAT and GST (13.9 g/kg isoleucine). The TRAP was higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin. The interest in this type of determination is because they can provide information regarding the system's capacity to withstand OS unbalances (Evelson et al., 2001).

LPO is an important cause of the deterioration of muscle. The fish muscle is particularly susceptible to lipid oxidation because of the coexistence of highly oxidisable long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and pro-oxidant substances with the ability to

catalyze lipid oxidation, such as redox-active metals and heme proteins (Erickson, 2002). The LPO levels were lower in the muscle of silver catfish receiving diets containing rutin. The GPx activity was higher in the fish receiving 0.15 and 0.30 % rutin, in accordance with Elia et al. (2011). GPx catalyzes the conversion of both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic hydroperoxides to less reactive products, employing GSH in its reduced form as an electron donor (Lackner, 1998).

Moreover, NPSH, AA content and TRAP were higher in the muscle of fish receiving 0.30 % rutin than in the control. Similar to our results, Menezes et al. (2013) also showed increased levels of NPSH and AA in muscle tissue.

Tissues and organs have different rates of metabolic activity and oxygen consumption, and their levels of antioxidants are different. In general, the susceptibility of a given organ to LPO is determined by different predispositions. For example, for xenobiotic accumulation, characteristic antioxidant basal levels, adaptation capacity and consequent antioxidant activation, and metabolic rates increase the potential to produce ROS and challenge the respective defenses (Oliveira et al., 2008).

In the present study, the addition of flavonoid rutin to the silver catfish's diet caused a reduction in the LPO levels of most tissues and was occasionally accompanied by the modulation of the antioxidant defense. Thus, rutin exerts an antioxidant effect on lipid membranes. This effect is attributed to its anti-free radical properties, mainly directed at the superoxide and hydroxyl radicals, which are highly reactive species involved in the initiation of the LPO chain (Afanas'ev et al., 1989). Furthermore, the lowest concentration of rutin (0.15%) in the diet was beneficial and resulted in an increased antioxidant response. Apart from being a natural product with low cost to the producer, it may be an important tool to minimize physiological changes and improve animal welfare. This finding is in agreement with the results found in the phenolic compounds, which were present in larger amounts in the lower concentration of rutin in the diet.



## Acknowledgments

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX), the Ministry of Fisheries and Aquaculture/Ministry of Science and Technology/FINEP and INCT ADAPTA-CNPq-FAPEAM.

## References

- Adamante, WB, Nuñez, APO, Barcellos, LJG, Soso, AB & Finco, JA (2008). Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science*, 60, 755-61.
- Afanas'ev, I., Dorozhko, A., Brodski, A., Kostyuk, V. & Potapovitch, A. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38, 1763-1769.
- Álvarez, A., García, BG, Jordan, MJ, Conesa, C & Hernández, MD (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 132, 1395-1405.
- Aron, PM & Kennedy, A. (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 79-104.

- Azambuja, CR, Mattiazzi, J., Riffel, APK, Finamor, IA, Garcia, LO, Heldwein, CG, Heinzmann, BM, Baldisserotto, B., Pavanato, M. & Llesuy, SF (2011). Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture*, 319, 156-161.
- Barcellos, LJG, Kreutz, LC, Rodrigues, LB, Fioreze, I., Quevedo, RM, Cericato, L., Conrad, J., Soso, AB, Fagundes, M., Lacerda, LA & Terra, S., (2003). Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, 34, 1565-1469.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973). Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134, 707-716.
- Buege, JA & Aust, SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
- Cos, P., Ying, L. & Calomme, M. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitor of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 71-6.
- Elia, AC, Prearo, M., Pacini, N., Dörr, AJM & Abete, MC (2011). Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 166-173.

- Ellman, J. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Erickson, MC (2002). Lipid oxidation of muscle foods. In C. C. Akoh & D. B. Min (Eds.), *Food lipids. Chemistry, nutrition, and biotechnology* (pp. 365–411). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Evans, DH, Piermarini, PM & Choe, KP (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-Base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85, 97-177.
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S. & Lissi, EA (2001). Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 261-266.
- Fagundes, M. & Urbinati, EC (2008). Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, 276, 112-119.
- Flohé, L. & Gunzler, WA (1984). Assays of glutathione peroxidase. In SP, Colowick, ON, Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology* (pp. 114-121). San Diego: Academic Press.
- Habig, WH, Pabst, MJ & Jakoby, WB (1974). Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.

- Halliwell, B. & Gutteridge, JMC (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31, 1454-1468.
- Harrison, FE & May, JM (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radicals Biology and Medicine*, 46, 719–730.
- Hirsch, D., Pereira-Júnior, DJ, Logato, PVR, Piccoli, RH & Figueiredo, HCP (2006). Identification and antimicrobial resistance of *Aeromonas* species isolated mobile fish and aquatic environments. *Science and Agrotechnology*, 30, 1211-1217.
- Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, K. & Osakai, T. (2002). Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1572, 123-132.
- Kamper, EJ & Zijlstra, WG (1964). Standardization of haemoglobinometry. In Boroviczény (Ed.), *Erythrocytometric methods and their standardization*, (pp. 35-62).
- Kim, KH, Lee, KW, Kim, DY, Park, HH, Kwon, IB & Lee, HJ (2005). Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresource Technology*, 96, 1709-12.
- Kütter, MT, Romano, LA, Ventura-Lima, J., Tesser, MB & Monsserat, JM (2014). Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 162, 70-76.

- Lackner, R. (1998) "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. *Fish Ecotoxicology*, 86, 203-224.
- Lazzari, R., Radünz-Neto, J., Pedron, FA, Veiverberg, CA, Bergamin, GT, Lima, RL, Emanuelli, T. & Steffens, C. (2008). Performance and fillet composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) submitted to different diets in the rearing. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science*, 60, 477-484.
- Li, J., Liang, XF, Tan, Q., Yuan, X., Liu, L., Zhou, Y. & Li, B. (2014). Effects of vitamin E on growth performance and antioxidants status in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture*, 430, 21-27.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farra, L. & Randall, RJ (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lushchak, VI & Bagnyukova, TV (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, 283-289.
- Menezes, C., Leitemperger, J., Toni, C., Santi, A., Lópes, T., Barbosa, MBV, Radünz Neto, J. & Loro, VL (2013). Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 706-714.

- Menezes, C., Leitemperger, J., Santi, A., Dias, G., Pedron, FA, Radünz Neto, J., Salman, SM, Barbosa, MBV & Loro, VL (2014). Evaluation of the effects induced by dietary diphenyl diselenide on common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 141-149.
- Mieiro, CL, Pereira, ME, Duarte, AC & Pacheco, M. (2011). Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*) - Bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquatic Toxicology*, 103, 233-240.
- Misra, HP & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.
- Monserrat, JM, Garcia, ML, Ventura-Lima, J., González, M., Ballesteros, ML, Miglioranza, KSB, Amé, MV, Wunderlin, DA (2014). Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenysia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 108, 8-15.
- Oliveira, M., Pacheco, M. & Santos, MA (2008). Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment*, 396, 70-78.

- Roe, JH & Kuether, CA (1942). The determination of ascorbic acid in whole blood and urine thought the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 339-407.
- Singleton, VL, Orthofer, R. & Lamuela-Raventó's, RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Södergren, E., Nourooz-Zadeh, J., Berglund, L. & Vessby, B. (1998). Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 7, 137-146.
- Tocher, DR, Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, JO, Diaz, E., Bell, JG, Geurden, I. & Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*, 8, 195-203.
- Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Jiang, W., Li, S., Tang, L., Kuang, S., Feng, L. & Zhou, X. (2013). Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 572-580.
- Zheng, ZL, Tan, JYW, Liu, HY, Zhou, XH, Xiang, X & Wang, KY (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant, effect and

resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).  
*Aquaculture*, 292, 214-218.

### Captions

**Table 1-** Formulation (%) of the experimental diet.

**Table 2-** Hematological and biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen* fed with diets containing different concentrations of rutin.

**Table 3-** Biomarkers of oxidative stress in the brain, gills and liver of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin.

**Table 4-** Biomarkers of oxidative stress in the kidneys and muscle of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin.

**Fig. 1.** Total phenolic content of diets containing different concentrations of rutin. The data appear as the mean  $\pm$  SEM (n = 3). Different letters denote that the data are significantly different from the control at P < 0.05. GAE, gallic acid equivalents.

**Fig. 2.** The plasma cortisol levels of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin. The data appear as the mean  $\pm$  SEM (n = 12). Different letters denote that the data are significantly different from the control at P < 0.05.



**Table 1-** Formulation (%) of the experimental diet.

Ingredients	(%)
Soybeanmeal	30
Meatandbonemeal	35
Rice bran	12
Corn	15
Canola oil	3
Salt	1
Vitamins and minerals (premix) <sup>a</sup>	3
Phosphatedicalcium	1
Analyzed proximate composition	
Dry matter contente	92.36
Protein	46.17
Ether extract	10.54
Crude fiber	2.94
Mineral matter	14.29
Acid detergent fiber	2.91
Neutral detergent fiber	16.41

<sup>a</sup>Vitamin and mineral mixture (security levels per kilogram of product) — folic acid: 250 mg, pantothenic acid: 5,000 mg, antioxidant: 0.60 g, biotin: 125 mg, cobalt: 25 mg, copper: 2000 mg, iron: 820 mg, iodo: 100 mg, manganese: 3750 mg, niacin: 5000 mg, selenium: 75 mg, vitamin A: 1,000,000 UI, vitamin B1: 1250 mg, vitamin B12: 3750 mcg, vitamin B2: 2500 mg, vitamin B6: 2485 mg, vitamin C: 28,000 mg, vitamin D3: 500,000 UI, vitamin E: 20,000 UI, vitamin K: 500 mg, zinc: 17,500 mg.

**Table 2-** Hematological and biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen* fed with diets containing different concentrations of rutin.

	Diets (% rutin)		
	0	0.15	0.30
HCT <sup>a</sup>	23.04 ± 0.71	24.08 ± 0.90	22.71 ± 1.97
HGB <sup>b</sup>	5.44 ± 0.05	5.43 ± 0.11	5.77 ± 0.17
MCHC <sup>c</sup>	13.12 ± 0.55	13.98 ± 0.19	13.39 ± 0.65
GLU <sup>d</sup>	33.65 ± 1.55	39.54 ± 3.37	36.90 ± 3.06
LDH <sup>e</sup>	1494.33 ± 245.35	1208.58 ± 438.33	1290.14 ± 399.97
TRI <sup>f</sup>	185.17 ± 27.52	209.11 ± 39.35	150.29 ± 37.11
CHO <sup>g</sup>	203.12 ± 1.04	200.61 ± 6.11	212.94 ± 10.47
LDL <sup>h</sup>	38.93 ± 8.44	24.66 ± 6.08	39.79 ± 10.39
HDL <sup>i</sup>	160.98 ± 11.25	149.34 ± 14.30	134.43 ± 4.29
URE <sup>j</sup>	50.69 ± 6.31	50.13 ± 4.90	57.91 ± 9.89

<sup>a</sup>Hematocrit (%), <sup>b</sup>Hemoglobin (g/dL), <sup>c</sup>Mean cell hemoglobin concentration (g/dL), <sup>d</sup>Glucose, <sup>e</sup>Lactate dehydrogenase (U/L), <sup>f</sup>Triglycerides, <sup>g</sup>Cholesterol, <sup>h</sup>Low-density lipoprotein cholesterol, <sup>i</sup>High-density lipoprotein cholesterol, <sup>j</sup>Urea are mg/dL. Data are presented as the mean ± SEM (n = 12). Means obtained showed no significant difference (P < 0.05).

**Table 3-** Biomarkers of oxidative stress in tissues of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin.

	Diets (% rutin)		
	0	0.15	0.30
<i>Brain</i>			
PROTEIN <sup>a</sup>	5.32 ± 0.08 <sup>A</sup>	4.92 ± 0.27 <sup>A</sup>	4.92 ± 0.29 <sup>A</sup>
TBARS <sup>b</sup>	2.84 ± 0.10 <sup>A</sup>	1.70 ± 0.08 <sup>B</sup>	1.62 ± 0.09 <sup>B</sup>
LOOH <sup>c</sup>	11.18 ± 0.66 <sup>A</sup>	5.13 ± 0.31 <sup>B</sup>	4.27 ± 0.37 <sup>B</sup>
SOD <sup>d</sup>	1.15 ± 0.09 <sup>A</sup>	2.82 ± 0.17 <sup>B</sup>	2.34 ± 0.11 <sup>B</sup>
CAT <sup>e</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>AB</sup>
GPx <sup>f</sup>	18.03 ± 3.84 <sup>A</sup>	29.34 ± 4.06 <sup>A</sup>	35.00 ± 2.63 <sup>A</sup>
GST <sup>g</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>A</sup>
NPSH <sup>h</sup>	5.80 ± 0.10 <sup>A</sup>	6.70 ± 0.25 <sup>B</sup>	6.60 ± 0.15 <sup>B</sup>
AA <sup>i</sup>	71.50 ± 7.74 <sup>A</sup>	144.20 ± 12.27 <sup>B</sup>	117.60 ± 19.05 <sup>AB</sup>
TRAP <sup>j</sup>	1.80 ± 0.30 <sup>A</sup>	3.54 ± 0.24 <sup>B</sup>	3.55 ± 0.40 <sup>B</sup>
<i>Gills</i>			
PROTEIN <sup>a</sup>	10.77 ± 0.45 <sup>A</sup>	11.79 ± 0.33 <sup>A</sup>	11.64 ± 0.77 <sup>A</sup>
TBARS <sup>b</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>B</sup>
LOOH <sup>c</sup>	6.58 ± 0.33 <sup>A</sup>	2.85 ± 0.37 <sup>B</sup>	4.45 ± 0.57 <sup>B</sup>
SOD <sup>d</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>A</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>A</sup>
CAT <sup>e</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>A</sup>
GPx <sup>f</sup>	8.00 ± 0.43 <sup>A</sup>	10.90 ± 0.94 <sup>A</sup>	13.50 ± 2.13 <sup>A</sup>
GST <sup>g</sup>	0.72 ± 0.05 <sup>A</sup>	1.98 ± 0.08 <sup>B</sup>	1.14 ± 0.08 <sup>B</sup>
NPSH <sup>h</sup>	5.88 ± 0.20 <sup>A</sup>	6.85 ± 0.19 <sup>A</sup>	6.45 ± 0.36 <sup>A</sup>
AA <sup>i</sup>	20.0 ± 1.63 <sup>A</sup>	16.9 ± 2.23 <sup>A</sup>	21.0 ± 2.42 <sup>A</sup>
TRAP <sup>j</sup>	0.83 ± 0.13 <sup>A</sup>	1.60 ± 0.13 <sup>AB</sup>	1.98 ± 0.29 <sup>B</sup>
<i>Liver</i>			
PROTEIN <sup>a</sup>	12.27 ± 0.33 <sup>A</sup>	11.90 ± 0.28 <sup>A</sup>	11.79 ± 0.30 <sup>A</sup>
TBARS <sup>b</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>B</sup>
LOOH <sup>c</sup>	5.57 ± 0.27 <sup>A</sup>	3.22 ± 0.32 <sup>B</sup>	4.12 ± 0.23 <sup>B</sup>
SOD <sup>d</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>A</sup>	1.03 ± 0.03 <sup>B</sup>	1.17 ± 0.08 <sup>B</sup>
CAT <sup>e</sup>	1.55 ± 0.12 <sup>A</sup>	3.09 ± 0.08 <sup>B</sup>	2.60 ± 0.06 <sup>AB</sup>
GPx <sup>f</sup>	13.30 ± 0.96 <sup>A</sup>	16.09 ± 0.74 <sup>A</sup>	15.34 ± 1.75 <sup>A</sup>
GST <sup>g</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>AB</sup>
NPSH <sup>h</sup>	2.70 ± 0.08 <sup>A</sup>	3.10 ± 0.07 <sup>B</sup>	3.10 ± 0.05 <sup>B</sup>
AA <sup>i</sup>	7.23 ± 1.81 <sup>A</sup>	14.50 ± 1.01 <sup>B</sup>	13.60 ± 0.94 <sup>B</sup>
TRAP <sup>j</sup>	1.84 ± 0.15 <sup>A</sup>	3.04 ± 0.17 <sup>B</sup>	2.93 ± 0.15 <sup>B</sup>

<sup>a</sup>Protein content (mg/mL), <sup>b</sup>Thiobarbituric acid reactive substances (µmol/mg protein), <sup>c</sup>Lipid hydroperoxide (nmol/mg protein), <sup>d</sup>Superoxide dismutase (SOD units/mg protein), <sup>e</sup>Catalase (µmol/mg protein), <sup>f</sup>Glutathione peroxidase (nmol/min/mg protein), <sup>g</sup>Glutathione S-transferase (µmol/min/mg protein), <sup>h</sup>Non-protein thiols (nmol/mg protein), <sup>i</sup>Ascorbic acid (µmol/mg protein), <sup>j</sup>Total reactive antioxidant potential (µMTrolox/mg

protein). Data are reported as the mean  $\pm$  SEM (n = 12). Values within the same row having different superscripts are significantly different (P < 0.05).

**Table 4-** Biomarkers of oxidative stress in the kidneys and muscle of *Rhamdia quelen* fed diets containing different concentrations of rutin.

	Diets (% rutin)		
	0	0.15	0.30
<i>Kidneys</i>			
PROTEIN <sup>a</sup>	19.41 ± 0.42 <sup>A</sup>	18.77 ± 0.44 <sup>A</sup>	20.03 ± 0.45 <sup>A</sup>
TBARS <sup>b</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.70 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>A</sup>
LOOH <sup>c</sup>	5.00 ± 0.22 <sup>A</sup>	2.9 ± 0.25 <sup>B</sup>	2.4 ± 0.34 <sup>B</sup>
CAT <sup>e</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>A</sup>	1.39 ± 0.09 <sup>B</sup>	1.18 ± 0.09 <sup>AB</sup>
GPx <sup>f</sup>	6.08 ± 0.37 <sup>A</sup>	8.52 ± 1.58 <sup>A</sup>	6.64 ± 0.67 <sup>A</sup>
GST <sup>g</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>AC</sup>
NPSH <sup>h</sup>	3.86 ± 0.13 <sup>A</sup>	3.85 ± 0.15 <sup>A</sup>	3.87 ± 0.24 <sup>A</sup>
AA <sup>i</sup>	13.52 ± 1.74 <sup>A</sup>	15.41 ± 5.17 <sup>A</sup>	19.32 ± 2.12 <sup>A</sup>
TRAP <sup>j</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>A</sup>	1.35 ± 0.04 <sup>B</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>B</sup>
<i>Muscle</i>			
PROTEIN <sup>a</sup>	10.07 ± 0.34 <sup>A</sup>	10.61 ± 0.40 <sup>A</sup>	10.55 ± 0.74 <sup>A</sup>
TBARS <sup>b</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>B</sup>
LOOH <sup>c</sup>	5.81 ± 0.42 <sup>A</sup>	3.79 ± 0.24 <sup>B</sup>	2.70 ± 0.32 <sup>B</sup>
SOD <sup>d</sup>	3.40 ± 0.20 <sup>A</sup>	3.86 ± 0.18 <sup>A</sup>	4.14 ± 0.31 <sup>A</sup>
GPx <sup>f</sup>	9.17 ± 0.74 <sup>A</sup>	19.54 ± 1.23 <sup>B</sup>	16.06 ± 2.54 <sup>B</sup>
GST <sup>g</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>A</sup>
NPSH <sup>h</sup>	4.37 ± 0.25 <sup>A</sup>	4.90 ± 0.29 <sup>AB</sup>	6.04 ± 0.41 <sup>B</sup>
AA <sup>i</sup>	3.37 ± 0.87 <sup>A</sup>	5.37 ± 1.10 <sup>AB</sup>	9.41 ± 1.51 <sup>B</sup>
TRAP <sup>j</sup>	1.49 ± 0.12 <sup>A</sup>	2.80 ± 0.15 <sup>B</sup>	2.84 ± 0.21 <sup>B</sup>

<sup>a</sup>Protein content (mg/mL), <sup>b</sup>Thiobarbituric acid reactive substances (μmol/mg protein), <sup>c</sup>Lipid hydroperoxide (nmol/mg protein), <sup>d</sup>Superoxide dismutase (SOD units/mg protein), <sup>e</sup>Catalase (μmol/mg protein), <sup>f</sup>Glutathione peroxidase (nmol/min/mg protein), <sup>g</sup>Glutathione S-transferase (μmol/min/mg protein), <sup>h</sup>Non-protein thiols (nmol/mg protein), <sup>i</sup>Ascorbic acid (μmol/mg protein), <sup>j</sup>Total reactive antioxidant potential (μMTrolox/mg protein). Data are reported as the mean ± SEM (n = 12). Values within the same row having different superscripts are significantly different (P < 0.05).

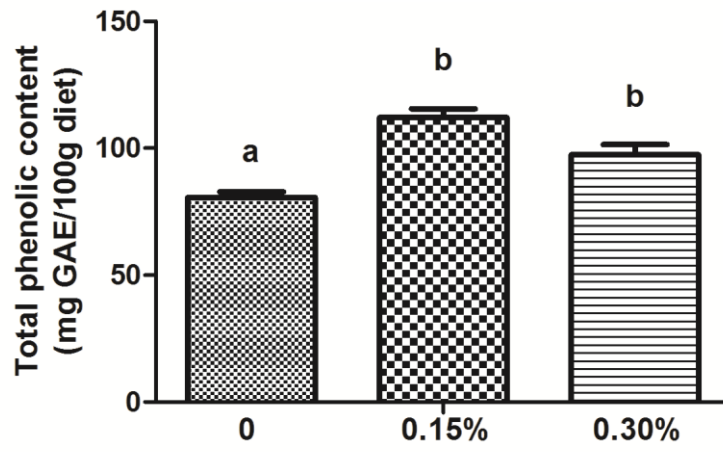
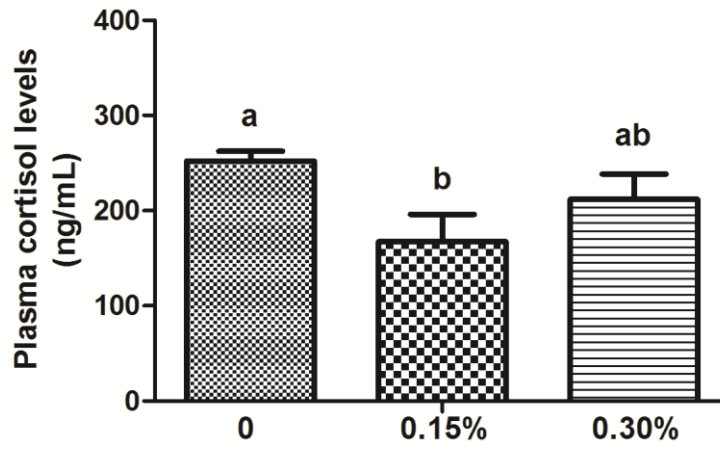
**Fig. 1.**

Fig. 2.



## 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, podemos concluir que a adição do flavonoide rutina nas concentrações testadas na dieta do jundiá não altera os parâmetros sanguíneos testados e influencia benéficamente os biomarcadores de OS. Assim, este flavonoide pode ser adicionado à dieta do jundiá por ser economicamente viável, tendo em vista que a obtenção é comercialmente fácil e de baixo custo.

As duas concentrações testadas da adição do flavonoide na dieta do jundiá foram capazes de reduzir a LPO, medida através de TBARS e dos LOOH, na maioria dos tecidos avaliados. Entretanto, jundiás alimentados com a dieta contendo 0.15 % de rutina, mostraram uma diminuição nos níveis do cortisol plasmático e nesta dieta encontrou-se o maior conteúdo dos compostos fenólicos. Além disso, a adição da rutina na dieta dos jundiás aumentou a atividade das enzimas antioxidantes em seus tecidos.

O conteúdo de NPSH, AA e TRAP também foram maiores na maioria dos tecidos de jundiás alimentados com a dieta contendo rutina, sugerindo que a adição deste flavonoide na dieta aumenta a resposta antioxidante não enzimática nos tecidos. O aumento observado se deve ao efeito antioxidante da rutina, que é capaz de eliminar os RL, regular o estado antioxidante endógeno, quelar metais e manter o equilíbrio pró-antioxidante/antioxidante, que posteriormente diminui o ataque de RL na membrana de lipídeos e atenua os danos do tecido, evitando a propagação da LPO.

Deste modo, a utilização de rações enriquecidas com rutina pode ser interessante no cultivo de peixes de modo a evitar a ação tóxica frente a poluentes ambientais, tendo em vista que em algumas práticas na aquicultura incluem a utilização de compostos que induzem o estresse oxidativo. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar o mecanismo de ação da rutina na dieta para os jundiás.



## REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Australia. Editora: Landes Bioscience and Springer Science +Business Media, p. 154-171, 2008.

ALMEIDA, S.P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa-CPAC, Planaltina, DF, p. 150-155, 1998.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides. In.: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, p. 3-44, 2003.

ALMROTH, B.C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 171-180, 2005.

ALY, N. et al. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 7-12, 2010.

ANNAPURNA, A. et al. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin induced type I diabetic rats. **Journal of Pharmacology**, v. 61, p.1365-1374, 2009.

AWAD, E.; AUSTIN, D.; LYNDON, A. R. Effect of dietary supplement of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and Nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, v. 13, 2013.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia* sp.) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 303-325, 2005.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1565-1469, 2003.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Revista de Nutrição**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n.1, p.187-191, 2005.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-601, 1979.

CHUA, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, p. 805-817, 2014.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 637-46, 2000.

COSTA, R.P. et al. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 10, p. 819-32, 2000.

DABROWSKI, K.; LEE, K.J. Quercetin - A new phytochemical in fish diets formulations. **Aquaculture**, p. 157, 2001.

DIPLOCK, A.T. et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 77-112, 1998.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Review Nutrition**, v. 18, p. 872-78, 2002.

FENG, L. et al. Antioxidant status of serum, muscle, intestine and hepatopancreas for fish fed graded levels of biotin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 499-510, 2014.

FENG, L. et al. Effects of dietary histidine on antioxidant capacity in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 559-571, 2012.

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, n. 1, p. 61- 8, 1997.

FUNABIKI, R. et al. Dietary supplement of g-rutin reduces oxidative damage in the rodent model. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 1078-1082, 1999.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and block high fat diet-induced obesity and fatty liver in mice. **Pharmacology Research**, v. 30, p. 2940-2950, 2013.

GAO, Z.; XU, H.; HUANG, K. Effects of rutin supplementation on antioxidant status and iron, copper, and zinc contents in mouse liver and brain. **Biological Trace Element Research**, v. 88, 2002.

GOLDBERG, D.M.; HANH, S.E.; PARKES, J.G. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. **Clínica Chimica Acta**, v. 237, p. 155-187, 1995.

GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GOMIERO, L.M.; SOUZA, U.P.; BRAGA, F.M.S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen*. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, 2007.

GRANGEIRO, M.S. **Bioprospecção de ação antioxidante de flavonóides em culturas de células gliais tratadas com catecol**. Feira de Santana, 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

GULPINAR, A.R. et al. Estimation of *in vitro* neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. **Food Research International**, v. 36, p. 536-543, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4<sup>a</sup> ed., New York: Oxford University Press, 2007.

HAO, H.H. et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Life Sciences**, v. 91, p. 959-967, 2012.

HASUMURA, M. et al. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 439-444, 2004.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Nutrition Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

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

HSIEH, T.J. et al. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 581-588, 2008.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, p. 43-46, 1996.

IBAMA. **Estatística da Pesca**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007.

JANBAZ, K.H.; SAEED, A.S.; GILANI, A.H. Protective effect of rutin on paracetamol and CC14-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557-563, 2002.

KERDUDO, A. et al. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 159, p. 12-19, 2014.

KHAN, A. R.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 204, 2012.

KRIS-ETHERTON, P., et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.

LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p. 45-53, 2000.

LEE, C.C. et al. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury. **Food and Function**, v. 4, p. 794, 2013.

LILAMAND, M. et al. Flavonoids and arterial stiffness: Promising perspectives. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 7, p. 698-704, 2014.

LIN, Y.H.; SHIAU, S.Y. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. **Aquaculture**, v. 267, p. 38-43, 2007.

LIU, T.Z. et al. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 31, 383-390, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum. v. 2, p. 368, 2002.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13-30, 2011.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 144, p. 283-289, 2006.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. M.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p.75-88, 2005.

MEYDANI, M. et al. The effect of long term dietary supplementation with antioxidants. In: HARMAN, D. et al. (Ed.). Towards prolongation of the healthy life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854. p. 78-91, 1998.

MEYERS, K.J.; RUDOLF, J.L.; MITCHELL, A.E. Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 830-836, 2008.

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 221-234, 2007.

NDONG, D.; FALL, J. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). **Fishery Biology**, 2007.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418, 2001.

OHARA, A. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

PAN, P.H. et al. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. **Free radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 106-116, 2014.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v.57, n.5, p. 371-389, 1991.

PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. *In*: MARRONI, N.P. (org). **Estresse Oxidativo e Inflamação: dos Modelos Experimentais à Clínica**. Canoas: Ed. ULBRA, p. 12-24, 2008.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PLUMB, G.W.; PRICE, K.R.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. **Redox Report**, v. 4, p. 123-127, 1999.

PORTZ, L. 2006. Recentes Avanços na Imuno-Nutrição de Peixes. *In*: TAVECHIO, W.L.G et al. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto da pesca**, v. 35, p. 335-341, 2009.

PUANGKAEW, J. et al. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 140, p. 187-196, 2005.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RODRIGUES, H.G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de HDL-col. **Revista de Nutrição**, v.16, n. 3, p. 315-20, 2003.

RODRIGUEZ, G. et al. Evaluation of two phytochemicals, genistein and quercetin as possible sex differentiation affecting agents in *Tilapia nilotica* by dietary administration. **Aquaculture**, p. 505, 2004.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 222, 2008.

RUSSO, A.R. et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 91-98, 2000.

SANTOS, E.L.; LUDKE, M.C.M.M.; LIMA, M.R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 789-800, 2009.

SCHULZ, U.H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of south american silver Catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 565-574, 2006.

SEGNER, H. et al. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 85-105, 2012.

SHENBAGAM, M.; NALINI, N. Dose response effect of rutin a dietary antioxidant on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance – a histopathologic study. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 493-502, 2011.

SHEU, J.R. et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4414-18, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156 f. Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History. Stockholm, 1996.

SOBERON, J.R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1450-1461, 2007.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733.1996.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**, v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003.

THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C.M. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal American Dietetic Association**, v. 99, p. 1280-1281, 1999.

TZCHORI, I. et al. The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 b on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 35, p. 1213-1219, 2004.

VAN DER WATT, E.; PRETORIUS, J.C. Purification and identification of active antibacterial components in *Corpobrotus edulid* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p.87-91, 2001.

VIJAYAVEL, K., et al. Dietary ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 157-163, 2006.

WEBSTER, R.P.; GAWDE, M.D.; BHATTACHARYA, R.K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. **Cancer Letters**, v. 109, p. 185-191, 1996.

WILHELM FILHO, D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1229-1237, 2007.



WOJDYŁO A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

WOOD, J.E. et al. Biologically active compounds from *Ozothamus leptophyllus*. **New Zeland Journal of Botany**, v. 37, p. 167-174, 1999.

YEH, C.H. et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK–NF- $\kappa$ B pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 249-257, 2014.

YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapeutic Research**, v. 11, p. 446-449, 1997.

ZHAO, J. et al. Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish and Shellfish Immunology**, 35, 572-580, 2013.