



*Atividade das enzimas de defesa antioxidante do  
fígado de pós-larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*),  
alimentados com diferentes níveis de vitaminas*

Catarina Santos de Almeida

2018



*Atividade das enzimas de defesa antioxidante do  
fígado de pós-larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*),  
alimentados com diferentes níveis de vitaminas*

Catarina Santos de Almeida

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos  
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Maria Coelho  
Baptista e co-orientação da Doutora Laura Braga Ribeiro



**Atividade das enzimas de defesa antioxidante do fígado de pós-larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*) alimentados com diferentes níveis de vitaminas**

**Copyright** © Catarina Santos de Almeida

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor.



## Agradecimentos

---

Agora que esta etapa chegou ao fim, quero agradecer a todas as pessoas que ao longo deste percurso contribuíram de uma maneira ou de outra para que a minha formação académica fosse realizada com sucesso.

À minha família, em especial, aos meus pais e irmã, que nunca deixaram de acreditar em mim e nas minhas capacidades. A eles por terem sido um porto de abrigo que me ajudaram a manter a sanidade mental. Sem eles, nada disto seria possível!

À minha orientadora Especialista Teresa Baptista agradeço de forma sentida todo o acompanhamento e disponibilidade demonstrada ao longo desta etapa.

À minha co-orientadora Doutora Laura Ribeiro por tão bem me receber numa nova instituição, proporcionando-me todo o apoio incondicional que em muito elevou os meus conhecimentos científicos, por todas as palavras reconfortantes que me deram força para nunca desistir. Pelo seu profissionalismo, espírito crítico e bom humor. Um muito obrigado!

À EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, e aos seus colaboradores, pela oportunidade, receção calorosa e apoio dado ao longo de todo o estágio.

Um obrigado especial à Conceição Batista, por todas as horas passadas no laboratório, que foram uma ajuda indispensável, e pelas palavras encorajadoras que sempre me prestou.

À Damiana Pires um enorme obrigada por todo o apoio e amizade durante a aventura atribulada pelo Algarve. Por me incentivar a cada dia e me mostrar que sempre é possível dar a volta por cima, porque afinal de contas amamos o que fazemos e só por isso já vale a pena!

À Catarina Perfeito e Joana Galante que sempre demonstraram que é possível ter uma amizade pura, estando sempre presente nos piores e maus momentos. Obrigado pelo apoio incondicional e pelas palavras de força que de alguma maneira me ajudaram a ultrapassar esta etapa da minha vida.

À Marta Jacinto não poderia deixar de agradecer. Foi sem dúvida um exemplo de força e coragem para mim ao longo de todo este percurso. Por todas as vivências que partilhámos e por todas as palavras sábias, um enorme obrigado!

A todos um muito obrigado!



## Resumo

---

Durante os estádios iniciais de desenvolvimento, as larvas de peixes marinhos exibem elevadas taxas de crescimento e de diferenciação dos seus tecidos e órgãos. Portanto, é esperado elevado metabolismo e diferenciação celular, com conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes produtos do metabolismo são conhecidos por causar stress oxidativo, com efeito prejudicial no crescimento e sobrevivência das larvas de peixes. Esses organismos têm defesas antioxidantes eficazes para proteger as células do stress oxidativo, mas a eficiência desses mecanismos depende do suprimento adequado de antioxidantes na dieta, como as vitaminas. Portanto, é possível e evidente que a dieta possa ter um papel protetor contra os ROS.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade das enzimas do stress oxidativo em pós-larvas de robalo alimentadas com diferentes formulações vitamínicas. De modo a perceber se essas formulações eram favoráveis para garantirem sobrevivência a estes organismos, o desempenho do crescimento foi determinado de acordo com as medidas do peso seco e comprimento total. Além disso, para avaliar se as dietas proporcionaram defesa contra o stress oxidativo, analisou-se as respostas das enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). O possível dano oxidativo devido à peroxidação lipídica foi também avaliado pela formação de malondialdeído.

Com base nos resultados obtidos foi possível verificar que as pós-larvas de robalo alimentadas com as diferentes dietas experimentais apresentaram crescimento similar entre os tratamentos, revelando que não afetaram o seu desempenho e sobrevivência. As dietas também não afetaram significativamente as atividades das enzimas antioxidantes entre as dietas. Relativamente aos eventuais danos oxidativos, a análise da peroxidação lipídica indicou que os níveis de produção de malondialdeído produzidos não foram também significativos.

Conclui-se que as formulações vitamínicas das dietas não afetaram o sistema antioxidante nem causaram danos nos organismos em estudo, permitindo assim um melhor desempenho no crescimento. Desse modo, este tipo de formulações aqui testadas tem potencial para serem suplementos benéficos a incluir nas dietas inertes para aquacultura, mantendo ou melhorando a defesa antioxidante e reduzindo as eventuais perdas que possam surgir devido à exposição da ação dos ROS.

**Palavras-Chave:** Aquacultura, Nutrição, Larvas de peixes, Stress oxidativo, Enzimas antioxidantes



## Abstract

---

During the early stages of development, marine fish larvae exhibit high rates of growth and differentiation of their tissues and organs. Therefore, high metabolism and cellular differentiation is expectable, with consequent production of reactive oxygen species (ROS). These products of metabolism are known to cause oxidative stress, with detrimental effect on growth and survival of fish larvae. These organisms have effective antioxidant defences to protect cells from oxidative stress, but the efficiency of these mechanisms depends on the adequate supply of dietary antioxidants, such as vitamins. So, it is possible and evident that diet might play a protective role against ROS.

This study aimed to evaluate the activity of oxidative stress enzymes in post-larvae of sea bass fed with different vitamin formulations. In order to understand if these formulations were favourable to ensure survival to these organisms, growth performance was determined according to dry weight and overall length measurements. In addition, to evaluate if the diets provided defence against oxidative stress, the responses of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) were analysed. The possible oxidative damage due to lipid peroxidation was also evaluated by the formation of malondialdehyde.

Based on the results obtained, it was possible to verify that the post-larvae fed with the different experimental diets exhibited similar growth among the treatments, showing that they did not affect its performance and survival. The diets did not also affect significantly the activities of antioxidant enzymes among diets. Regarding the possible oxidative damages, the analysis of lipid peroxidation indicated that the production levels of malondialdehyde produced were also not significant.

It was concluded that the vitamin formulations of the diets did not affect the antioxidant system, nor did it cause damages in the organisms under study, thus allowing a better growth performance. The type of formulations tested here have favourable potential to be included in inert diets for aquaculture, maintaining or enhancing antioxidant defence and reducing any losses that may arise due to ROS exposure.

**Keywords:** Aquaculture, Nutrition, Fish larvae, Oxidative stress, Antioxidant enzymes

# Índice

---

1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Desenvolvimento Larvar em Aquacultura.....	3
2.2. Espécies reativas de oxigénio: formação, destoxificação e stress oxidativo.....	4
2.2.1. Formação de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS).....	4
2.3. Destoxificação de ROS: mecanismos de defesa antioxidante.....	5
2.3.1. Sistemas enzimáticos (CAT, SOD, GPx).....	6
2.3.2. Defesas não enzimáticas.....	8
2.3.2.1. Vitamina E.....	8
2.3.2.2. Vitamina C.....	10
2.3.2.3. Minerais antioxidantes.....	11
2.4. Suplementos vitamínicos na dieta de larvas de peixes marinhos.....	12
2.5. Stress Oxidativo.....	13
2.5.1. Peroxidação Lipídica.....	14
2.6. <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	15
2.7. Objetivos do estudo.....	17
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1. Condições do Cultivo Larvar.....	19
3.2. Condições experimentais.....	19
3.3. Preparação dos tecidos para determinações bioquímicas.....	20
3.4. Determinações Bioquímicas.....	22
3.4.1. Quantificação da Proteína.....	22
3.4.2. Enzimas antioxidantes.....	22
3.4.2.1. Superóxido Dismutase.....	22
3.4.2.2. Catalase.....	23
3.4.2.3. Glutathione Peroxidase.....	23
3.4.3. Peroxidação Lipídica.....	24
3.5. Análise Estatística.....	25
4. Resultados.....	27
4.1. Desempenho do crescimento larvar.....	27
4.2. Peso dos fígados.....	27
4.3. Efeito da dieta na resposta ao stress oxidativo.....	28

4.3.1. Enzimas antioxidantes .....	28
4.3.2. Dano Oxidativo .....	31
5. Discussão .....	33
6. Conclusão.....	39
7. Perspetivas Futuras.....	41
8. Referências Bibliográficas.....	43

## Índice de Figuras

---

Figura 1. Sistemas de cultivo larvar da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, onde se realizou o ensaio de nutrição com as pós-larvas de robalo, <i>Dicentrarchus labrax</i> , (volume dos tanques 300L) .....	20
Figura 2. Dissecção de uma pós-larva de robalo <i>Dicentrarchus labrax</i> , em vidro e mantida a 0°C .....	21
Figura 3. Recolha dos órgãos da cavidade abdominal (a) para obtenção dos fígados das pós-larva de robalo <i>Dicentrarchus labrax</i> (b*) .....	21
Figura 4. Homogeneização dos fígados recolhidos de cada pós-larva de robalo <i>Dicentrarchus labrax</i> utilizando o homogeneizador IKA T25 digital Ultra Turrax .....	22
Figura 5. Variação do peso seco (a) e do comprimento total (b) das pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> quando alimentadas com três tipos de dietas experimentais (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 50) .....	27
Figura 6. Comparação do peso dos fígados de pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> , (o valor de cada tanque corresponde a um <i>pool</i> de 30 fígados) alimentadas com dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 3) .....	27
Figura 7. Atividade da enzima Superóxido Dismutase nos fígados de pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num <i>pool</i> de 30 fígados .....	30
Figura 8. Atividade da enzima Catalase nos fígados de pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num <i>pool</i> de 30 fígados .....	30
Figura 9. Atividade das enzimas Glutathione Peroxidase Se-dependente (SeGPx) e Glutathione Peroxidase Se-independente (GPx) nos fígados de pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. As diferentes letras (a, b) representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para a mesma análise (ANOVA de um fator, P < 0,05). Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num <i>pool</i> de 30 fígados .....	30
Figura 10. Peroxidação Lipídica nos fígados de pós-larvas de <i>Dicentrarchus labrax</i> quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média $\pm$ Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num <i>pool</i> de 30 fígados .....	31



## Índice de Tabelas

---

**Tabela I** – Efeito das três dietas experimentais (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas nas enzimas antioxidantes (SOD, CAT, SeGPx e GPx) e na peroxidação lipídica (LPO) do fígado das pós-larvas de robalo *Dicentrarchus labrax*. As diferentes letras (a, b) representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para a mesma análise (ANOVA de um fator,  $P < 0,05$ ) ..... 28



## Lista de Abreviaturas

---

4-HNE - (2E)-4-hidroxi-2-nonenal

BSA (do inglês bovine serum albumin) - albumina de soro bovino

C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N - 1-methyl-2-phenylindole

CAT - catalase

CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S - ácido metanosulfônico

DAE - dia após eclosão

DNA (do inglês deoxyribonucleic acid) - ácido desoxirribonucleico

EDTA (do inglês ethylenediamine tetraacetic acid) – ácido etilenodiamino tetra-acético

GPx - glutathione peroxidase

GR - glutathione reductase

GSH - glutathione

GSSG - glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

L<sup>•</sup> - radical lipídico

LC-PUFA (do inglês long chain polyunsaturated fatty acids) - ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

LOO<sup>•</sup> - radical peróxido

LOOH - hidroperóxido lipídico

LPO - peroxidação lipídica

MDA - malondialdeído

NADPH (do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBT (do inglês nitroblue tetrazolium chloride) – cloreto de azul nitrotetrazólio

O<sub>2</sub> - oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - radical anião superóxido

OH<sup>•</sup> - radical hidroxilo

PBS (do inglês phosphate buffered saline) - tampão fosfato salino

PSU (do inglês practical salinity unit) – unidade de salinidade prática

PUFA (do inglês polyunsaturated fatty acids) - ácidos gordos polinsaturados

ROS (do inglês reactive oxygen species) - espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido dismutase



## 1. Introdução Geral

Com o crescimento exponencial das populações em paralelo com a sobreexploração dos recursos marinhos, tornou-se inevitável o aumento da produção em aquacultura (Naylor *et al.*, 2000; Boyd, 2003). Esta atividade permite produzir espécies que no meio natural não estão disponíveis ao longo de todo o ano em quantidades suficientes para a excessiva procura (Kole, 2003). Além disso, é um dos métodos mais eficientes de produzir proteína de origem animal de alta qualidade para a população humana, com baixo impacto ambiental (FAO, 2016; Tidwell e Bright, 2018; Valenti, *et al.*, 2018).

Sendo considerada um setor estratégico e inovador nos países que dispõem de recursos aquícolas, a aquacultura é uma das atividades económicas que mais se tem desenvolvido a nível mundial. De facto, a produção global de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos continuou a crescer e atingiu 171 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018).

Para manter essas elevadas produções, o crescimento sustentável na indústria de aquacultura, depende de um fornecimento constante de juvenis de elevada qualidade. Níveis baixos de crescimento e sobrevivência na fase juvenil, são normalmente atribuídos a fatores ambientais e nutricionais não controlados durante a criação de larvas. Uma vez que as influências inerentes ao desenvolvimento e qualidade dos peixes são multifatoriais, a melhoria da criação de larvas e especialmente a nutrição de peixes larvais é de suma importância para a indústria da aquacultura (Rudneva, 2014).

Em aquacultura a fase larvar de peixes é o período mais crítico da produção, no qual as larvas precisam de cumprir o desenvolvimento de sistemas de órgãos e amadurecer ainda mais as suas funções fisiológicas (Zengin e Yilmaz, 2016).

As elevadas taxas de crescimento e a diferenciação celular observada durante o desenvolvimento larvar até ao período juvenil pressupõem um forte metabolismo celular e, por conseguinte, um aumento na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Costantini, 2014; Smith *et al.*, 2016). Essas moléculas instáveis se não forem neutralizadas por antioxidantes, oxidam proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, causando danos e, portanto, um estado de stress oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Na maioria dos organismos a capacidade de defesa antioxidante pode ser estimulada pelo fornecimento de uma formulação adequada do *premix* de micronutrientes antioxidantes, como as vitaminas e os minerais, na alimentação. No caso dos peixes marinhos, durante o

período de desenvolvimento os mecanismos endógenos de antioxidantes ainda não estão completamente desenvolvidos, pelo que a ingestão através da dieta de antioxidantes pode ser particularmente importante para o seu crescimento (Surai, 2002; Costantini, 2014).

A possibilidade de fortalecer a capacidade de defesa antioxidante das larvas e pós-larvas através da dieta, permite o desenvolvimento e/ou a otimização de formulações existentes. Assim o uso de biomarcadores que avaliam o stress oxidativo como as enzimas antioxidantes são uma ferramenta importante para avaliar a capacidade de resposta dos peixes contra potenciais danos provocados pelo stress oxidativo.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Desenvolvimento Larvar em Aquacultura

O desenvolvimento de peixes nos primeiros estádios de vida depende da especificidade da sua ecologia e biologia e como os mesmos se adaptam aos habitats (Rudneva, 2014). Durante o desenvolvimento, embriões e larvas de peixe são muito sensíveis ao meio ambiente que os rodeia (Hoar e Randall, 1988) e têm requisitos rigorosos para condições bióticas e abióticas para sobreviver, desenvolver e crescer adequadamente (Hamre *et al.*, 2013). Como tal, o processo de desenvolvimento de larvas de peixes em cultivo, pode ver-se afetado por múltiplos fatores ambientais (condições físicas: temperatura, salinidade, concentração de oxigénio; bem como poluentes) e, em particular, pela disponibilidade e composição da dieta durante os primeiros estádios larvares (Solé *et al.*, 2004; Jiménez-Fernández, 2015).

A nutrição é vital para a produção de organismos de alta qualidade. Mesmo antes da alimentação exógena as larvas de peixe dependem das reservas nutritivas e energéticas do saco vitelino para o seu crescimento, desenvolvimento e metabolismo (Tocher, 2003; Díaz *et al.*, 2010; Zengin, 2015). No momento em que se dá a abertura da boca da larva e esta é capaz de se alimentar sem depender da absorção das reservas provenientes do saco vitelino, inicia-se o fornecimento de alimento. A aceitabilidade do primeiro alimento exógeno é a primeira fase crítica do seu desenvolvimento, que requer uma adaptação e aprendizagem de captura das presas (zooplâncton) que devem estar disponíveis em quantidade e com qualidade (Pousão-Ferreira, 2009).

Considerando a vulnerabilidade das larvas de peixe, é sempre difícil identificar e atender aos requisitos nutricionais quando várias restrições fisiológicas e metabólicas estão ligadas e cada uma delas pode impedir o crescimento ou um desenvolvimento apropriado (Hamre *et al.*, 2013). A nutrição pode afetar os muitos mecanismos que controlam o desenvolvimento larvar de peixes e um défice de certos nutrientes durante esta etapa, pode gerar irreversíveis processos fisiológicos que determinem o desenvolvimento, a saúde e o bem-estar definindo, inclusive a baixa percentagem de sobrevivência na fase de larvicultura (Cahu *et al.*, 2003; Lopes, 2014).

Para além do suprimento de nutrientes e de energia, a disponibilidade de oxigénio, é vital para o desenvolvimento de embriões e larvas de peixe, onde o processo de metamorfose que engloba a divisão celular e a formação de novos tecidos, é especialmente crítico com alta

utilização de reservas energéticas, devido a um metabolismo elevado, que consome oxigénio mais exógeno para atender às demandas metabólicas. Esta dependência de oxigénio possivelmente pode desencadear uma saturação das defesas antioxidantes (Kalaimani *et al.*, 2008; Tovar-Ramírez *et al.*, 2010). Como tal, a elevada absorção de oxigénio exógeno pode ter o potencial de afetar os processos pro-oxidantes nos estadios iniciais do desenvolvimento dos peixes (Finn *et al.*, 1991).

É então coerente afirmar, que o stress ambiental e a evolução dos processos metabólicos aeróbios, como a respiração, inevitavelmente levam à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que podem afetar a integridade celular gerando disfunções morfológicas e/ou fisiológicas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Lesser, 2011; Tovar-Ramírez *et al.*, 2010). O processo de metamorfose é crítico a este respeito, devido ao alto consumo energético e possível saturação das defesas antioxidantes (Solé *et al.*, 2004). Todos os organismos aeróbios possuem enzimas antioxidantes capazes de prevenir danos nas células da membrana, inativação enzimática e alterações nos ácidos nucleicos.

O conhecimento das atividades dos enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e composições bioquímicas nos estadios iniciais de vida dos peixes são extremamente importantes na compreensão da formação de mecanismos de proteção durante o desenvolvimento larval no início da alimentação exógena. Nos peixes, a peroxidação lipídica causada pelos radicais de oxigénio é a principal causa de várias doenças (Mourente *et al.*, 1999). Consequentemente, a compreensão da dinâmica das enzimas antioxidantes poderá fornecer uma contribuição importante para o aumento da qualidade das larvas e dos juvenis.

## **2.2. Espécies reativas de oxigénio: formação, destoxificação e stress oxidativo**

### **2.2.1. Formação de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)**

Em organismos aeróbios, o oxigénio no seu estado molecular ( $O_2$ ) é essencial para muitos processos metabólicos e para a produção de energia eficiente, mas, paradoxalmente o seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular (Límon-Pacheco e Gonsebatt, 2009). Essas substâncias tóxicas, são constantemente produzidas durante o funcionamento normal da célula, aquando do transporte de eletrões, reações enzimáticas, ou ainda por reações de auto-oxidação, e estão na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), das quais fazem parte, o radical anião superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Klotz, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O radical superóxido é principalmente produzido nas mitocôndrias através de uma redução incompleta de oxigênio, em sistemas de transporte de elétrons da cadeia respiratória ou como um produto específico de sistemas enzimáticos existentes na célula (Fridovich, 1999). Estes elétrons, ao invés de reduzir o  $O_2$  a moléculas de água, reduzem o  $O_2$  a anião superóxido. Apesar do anião superóxido não ser um radical muito ativo, pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais, entre os quais o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Esses radicais podem então atacar as membranas celulares ou as suas lipoproteínas constituintes, bem como o DNA. Os seus efeitos deletérios incluem a oxidação de proteínas e a peroxidação de lípidos insaturados nas membranas celulares. Isso produz hidroperóxidos lipídicos instáveis, cujos produtos, ao se decomporem, são altamente reativos, ameaçando a integridade celular (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007; Rahman, 2007; Lushchak, 2014).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), embora não seja altamente reativo, também pode inibir algumas enzimas antioxidantes, principalmente criando efeitos tóxicos em vários locais subcelulares, devido à sua rápida capacidade de penetrar nas membranas celulares. Além disso,  $H_2O_2$  pode ser o responsável por produzir radicais  $OH^\cdot$  que podem atacar extensamente todo o tipo de macromoléculas em células vivas, incluindo lípidos, proteínas e DNA (Wright e Welbourn, 2002).

A dependência de oxigênio, força assim a vida aeróbia para resistir a uma toxicidade considerável (Ahmad, 1995). Dessa forma, os organismos aeróbios que não podem existir sem oxigênio, estão inerentemente em risco devido ao stress oxidativo (Davies, 2000; Valko *et al.*, 2004; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2010).

### **2.3. Destoxificação de ROS: mecanismos de defesa antioxidante**

Diante das consequências inevitáveis da toxicidade de  $O_2$ , a evolução forneceu estratégias defensivas adequadas (Martínez-Alvarez *et al.*, 2005), das quais fazem parte, os mecanismos de defesa antioxidante. Os sistemas antioxidantes nos organismos vivos podem ser divididos em dois tipos, um é representado por enzimas e o outro por moléculas de baixo peso molecular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Estes compostos podem ser encontrados com mais frequência em tecidos com funções relacionadas ao processamento de alimentos como fígado ou glândulas digestivas e ainda, no plasma celular, mitocôndrias ou membranas celulares (Livingstone, 2001).

Estas estratégias de defesa, que podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta, incluem diferentes níveis de proteção que atuam de modo a evitar a formação de ROS, a neutralizar estas espécies reativas e a reparar os danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrasa, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (Límon-Pacheco e Gonsebatt, 2009; Halliwell e Gutteridge, 2007).

### **2.3.1. Sistemas enzimáticos (CAT, SOD, GPx)**

As enzimas antioxidantes são cruciais no esforço para neutralizar a toxicidade do oxigénio quando o fornecimento de outros compostos antioxidantes é escasso ou inexistente (Ahmad, 1995).

As principais enzimas do sistema antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR) que já foram detetadas na maioria das espécies de peixes estudadas (Peters e Livingstone, 1996; Peters *et al.*, 2001; Fernández-Díaz *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2005; Cañavate *et al.*, 2007; Fontagné *et al.*, 2008).

Todas estas enzimas são muito importantes na defesa antioxidante, embora a SOD desempenhe um papel crucial sendo a principal defesa contra a toxicidade do oxigénio (Avilez *et al.*, 2008; Ameer *et al.*, 2012).

O substrato da superóxido dismutase é o radical superóxido gerado normalmente nos organismos aeróbios, durante o processo de oxidação. A SOD como não atravessa facilmente as membranas biológicas, conseqüentemente, deve ser desintoxicada no compartimento onde é gerada (Fridovich, 1995). Isso explica a presença de duas formas de SOD em eucariotas, uma contendo magnésio, encontrada na mitocôndria e outra com zinco e cobre, localizada no citoplasma (Berg *et al.*, 2004).

O mecanismo de reação inicia-se quando a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio (McCord e Fridovich, 1969).

O peróxido de hidrogénio quando em excesso, torna-se altamente nocivo à célula e como tal a sua remoção é fundamental na proteção da mesma contra o dano oxidativo. Com a finalidade de ser eliminado, este composto sofre dismutação pela catalase nos lisossomas ou pela glutathiona peroxidase nas mitocôndrias (Wright e Welbourn, 2002; Berg *et al.*, 2004).

Assim, em locais com concentrações relativamente altas de peróxido de hidrogénio, como peroxissomas, a catalase é uma importante enzima antioxidante, sendo capaz de decompor o peróxido de hidrogénio em oxigénio molecular e água. A atividade da catalase é importante para o monitoramento, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em stress oxidativo (Atli e Canli, 2007; Avilez *et al.*, 2008).

Como defesa antioxidante, a glutatona (GSH) desempenha várias funções, sendo um quelante de radicais livres ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{LOO}^\cdot$  e  $\text{ONOO}^\cdot$ ), quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como cofator de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx) (Pastore *et al.*, 2003).

A glutatona peroxidase caracteriza-se pela presença de um átomo de selénio (Se) ligado ao seu centro reativo, em forma de seleneto, que reduz o substrato peróxido a um álcool, que por sua vez oxida o ácido selénico. Essa reação permite a interação da enzima com a glutatona reduzida formando seleno-sulfeto (Berg *et al.*, 2004).

No processo de neutralização dos radicais livres, a glutatona (GSH) sintetizada intracelularmente, é oxidada ficando na forma de glutatona oxidada (GSSG) numa reação catalisada pela enzima glutatona peroxidase (GPx) (Apel e Hirt, 2004; Solé *et al.*, 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007; Tekman *et al.*, 2008).

Com a finalidade de manter o status redox da GSH, a glutatona redutase utiliza uma molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como fonte de eletrões e prótons para reduzir a GSSG gerada, e dessa forma regenerar a GSH intracelular (Berg *et al.*, 2004).

A glutatona (GSH) reduzida em tripeptídeos (ácido  $\gamma$ -glutamato, cisteína e glicina) desempenha um papel fundamental na proteção contra o stress oxidativo ao eliminar ROS diretamente (Leggatt e Iwama, 2009) e regenerando as vitaminas antioxidantes C e E de seus produtos oxidados (Lee e Dabrowski, 2003; Gao *et al.*, 2014).

Em suma, o antioxidante SOD catalisa a dismutação do anião superóxido para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultante é convertido em água e oxigénio pela CAT ou desintoxicado pela atividade da Gpx (Ritola *et al.*, 2002; Kalaimani *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Defesas não enzimáticas**

Uma segunda linha de defesa é estabelecida por antioxidantes de baixo peso molecular, como vitaminas e minerais, que podem ser fornecidos apenas por suplementos nutricionais (Sen, 1995).

Devido aos altos níveis de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) em organismos marinhos e uma vez que os componentes celulares não são totalmente protegidos por antioxidantes endógenos, as dietas induzidas com compostos antioxidantes de baixo peso molecular, tornam-se indispensáveis para a defesa apropriada contra os danos oxidativos. Estes são capazes de promover a resistência da membrana celular nos organismos em desenvolvimento contra o stresse oxidativo, sendo capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência (Cerqueira *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009).

#### **2.3.2.1. Vitamina E**

Estudos sobre o papel antioxidante das vitaminas indicaram que a vitamina E ou  $\alpha$ -tocoferol é o principal antioxidante lipossolúvel presente na membrana celular que a protege da oxidação de ácidos gordos, além de diminuir ou inibir a produção e ação de radicais de oxigénio (Montero *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2016).

Os tocoferóis convertem radicais livres em espécies mais estáveis por meio da doação de um átomo de hidrogénio ao radical lipídico, gerando produtos eletricamente estáveis ou menos reativos e impedindo assim a propagação da peroxidação lipídica. É importante notar que, ao proteger os lípidos da oxidação, a vitamina E converte-se num radical livre chamado tocoferila (menos reativo que o radical lipídico), que precisa de ser novamente transformado em tocoferol, por ação do ácido ascórbico, para recuperar o seu potencial antioxidante (Comhair e Erzurum, 2002).

Portanto, a menos que seja regenerada, a vitamina E precisará de ser reabastecida diretamente através da dieta (Burton e Traber, 1990).

De acordo com Tocher *et al.*, (2002), menores quantidades de vitamina E nas dietas levam à diminuição da sua concentração nos tecidos e ao aumento da atividade oxidante do organismo, o que resulta em elevadas concentrações de peróxidos lipídicos. Assim, em quantidades suficientes, a presença dessa vitamina evita a formação de lipoperóxidos tóxicos nos peixes (Navarro *et al.*, 2009).

Os sinais de deficiência dessa vitamina estão relacionados com a degeneração da membrana, decorrente da peroxidação dos lípidos e derivados, com queda no ganho de peso, degeneração muscular, hemorragia cutânea, escurecimento da pele, ineficiência reprodutiva, degeneração lipídica do fígado e, conseqüentemente, maior suscetibilidade ao stresse oxidativo (Izquierdo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004).

A degeneração lipídica do fígado no peixe foi descrita pela primeira vez no início do século XX. Esta doença está relacionada com a gordura oxidada em dietas e deficiência de vitamina E. Foi relatado que a suplementação dietética de vitamina E melhora a qualidade de peixes como a truta (Frigg *et al.*, 1990) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Gatta *et al.*, 2000).

Para prevenir o dano oxidativo ocasionado pela peroxidação lipídica, os peixes dependem do suprimento alimentar de antioxidantes essenciais, como a vitamina E, uma vez que níveis elevados de lípidos na dieta, aumentam os requisitos de vitamina E em peixes (Cowey *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1981). Muitos estudos mostraram que altos níveis de PUFA na dieta aumentam a peroxidação lipídica nos tecidos dos peixes (Stephan *et al.*, 1995; Olsen e Henderson, 1997; Tocher *et al.*, 2002b).

No entanto, outros estudos sobre a relação entre os PUFA: razão de vitamina E e defesas antioxidantes não conseguiram demonstrar a indução de tais defesas em peixes alimentados com dietas altas de PUFA, sugerindo que a dieta da vitamina E acima de um requisito mínimo não melhora significativamente as defesas antioxidantes (Stephan *et al.*, 1995; Lygren *et al.*, 2000; Mourente *et al.*, 2000; Tocher *et al.*, 2002b). Também é importante ter em mente que em larvas maiores os requerimentos de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA) devem estar associados a níveis dietéticos mais altos de vitamina E, como tem sido sugerido na carpa (*Cyprinus carpio*) (Watanabe *et al.*, 1981), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Hamre e Lie, 1995b) e dourada (*Sparus aurata*) (Atalah *et al.*, 2010). Nesse sentido, Izquierdo e Fernández-Palacios (1997) observaram um aumento no conteúdo de vitamina E da eclosão até 10 dias após eclosão (DAE), enquanto que a partir daí e até ao dia 20, o conteúdo diminuiu nas larvas de sargo (*Diplodus sargus*). Curiosamente, essa redução foi paralela à redução nos teores de PUFA larval ao longo do desenvolvimento larval (Izquierdo, 1988), sugerindo uma estreita relação entre os dois nutrientes. Por outro lado, dietas formuladas para larvas de peixes marinhos contêm altos níveis de PUFA e pró-oxidantes, por exemplo, na forma de minerais. Portanto, é importante suplementar as dietas de larvas de peixes marinhos com quantidade suficiente de vitamina E.

Os requisitos de vitamina E dependem não apenas dos lípidos alimentares, mas também da vitamina C, pois esta regenera a vitamina E. Assim, a vitamina E e a vitamina C juntas, agem como agentes antioxidantes tendo ambas papel protetor contra os radicais livres e protegendo os ácidos gordos essenciais (Izquierdo *et al.*, 2001; Rotta, 2003).

### **2.3.2.2. Vitamina C**

A vitamina C, ou ácido ascórbico é considerada um antioxidante “primário” ou “preventivo”, uma vez que reage com o oxigênio antes do início do processo oxidativo e participa do sistema de regeneração da vitamina E, sendo, portanto, de fundamental importância para manter o potencial antioxidante do plasma. Dessa forma, as vitaminas C e E agem conjuntamente, reduzindo a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guerra *et al.*, 2004).

Além disso, o ácido ascórbico interage com a vitamina E e com o selênio na manutenção da atividade das enzimas glutatona peroxidase e superóxido dismutase, importantes na eliminação de radicais oxidantes produzidos no metabolismo (Navarro *et al.*, 2009).

No entanto, foi relatado que a vitamina C pode desempenhar um papel mais eficaz na prevenção da peroxidação plasmática-lipídica do que a vitamina E (Sahyoun, 1997).

O ácido ascórbico assume importância considerável em vários processos metabólicos e está envolvido em várias funções fisiológicas em vertebrados, como crescimento, desenvolvimento esquelético, resistência a tóxicos e stress (Cahu *et al.*, 2003). Merchie *et al.*, (1995), mostraram que altos níveis de ácido ascórbico aumentaram a taxa de crescimento e a resistência ao stress nas larvas de peixe-gato africano. Além disso, o conteúdo em ácido ascórbico declina rapidamente durante o desenvolvimento embrionário em peixes (Cowey *et al.*, 1985). O ácido ascórbico fornecido através da dieta é crucial para o desenvolvimento de larvas de peixes, uma vez que a maioria das espécies não consegue sintetizar esta vitamina (Cahu *et al.*, 2003).

As larvas de peixes são particularmente sensíveis à deficiência de vitamina C (Dabrowski *et al.*, 1996), provavelmente tendo maior necessidade de vitaminas devido ao seu rápido crescimento e altos teores de PUFA nos alimentos larvares. Além disso, alto teor de ácido ascórbico foi encontrado em ovas de peixe (Kossmann, 1988; Dabrowski e Bloom, 1994), o que pode ser uma indicação da importância deste micronutriente durante o desenvolvimento inicial. A adição de vitamina C nas dietas larvares melhorou a sobrevivência, o desempenho de crescimento, o desenvolvimento do esqueleto, a resistência

ao stresse e a resposta imunológica em robalos e pregado (Merchie *et al.*, 1996) e em larvas de peixes marinhos (Atalah *et al.*, 2010). Além disso, colocou-se a hipótese de que nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário de organismos marinhos os antioxidantes de baixo peso molecular, como a vitamina C, desempenham um importante papel protetor contra o dano oxidativo, já que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes tem sido observado em larvas em desenvolvimento (Rudneva, 1999). Assim, o controlo da vitamina C administrada aos reprodutores, bem como a suplementação adequada de vitamina C para as larvas, são de vital importância para o equilíbrio do estado oxidativo das larvas de peixes marinhos.

### **2.3.2.3. Minerais antioxidantes**

Estudos nutricionais também revelaram o papel crucial de alguns minerais na prevenção do stress oxidativo. Por exemplo, manganês (Mn), cobre (Cu), selênio (Se) e zinco (Zn) são fatores nutricionais envolvidos na prevenção da peroxidação lipídica. O manganês está presente no SOD mitocondrial, enquanto os SODs citosólicos contêm Cu e Zn (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

O zinco tem papéis catalíticos e estruturais em enzimas, e as suas propriedades antioxidantes têm sido amplamente reconhecidas (Maret, 2000; Powell, 2000).

Entre outros efeitos, o zinco inibe a NADPH-oxidase – enzima envolvida na produção de ROS – e atua como cofator da superóxido dismutase, uma das enzimas do sistema antioxidante endógeno. Além disso, participa diretamente da neutralização do radical livre hidroxilo e induz a produção de metalotioninas, substâncias que também atuam na remoção desse radical (Prasad, 2008).

O selênio também é um mineral e um micronutriente essencial para vertebrados (Johansson *et al.*, 2005), mas é exigido em menor quantidade pois em concentrações elevadas pode tornar-se tóxico (Chassaing *et al.*, 2002; Polatajko *et al.*, 2006). É um componente essencial de várias vias metabólicas principais, incluindo metabolismo de hormonas tireoidianas, sistemas de defesa antioxidante e função imunológica. Uma das principais funções do selênio no organismo é como um componente das selenoproteínas, isoenzimas que protegem os componentes lipídicos e membranas, tanto a nível celular como subcelular, do dano oxidativo (Arteel e Sies, 2001). A glutathiona peroxidase é uma selenoproteína e o grau de atividade dessa enzima no fígado ou no plasma é indicado pela

presença de selênio no organismo e como tal, demonstrou-se que a sua concentração e atividade aumentam com o consumo de selênio (Burk, 2002; Lin e Shiau, 2005a)

É por isso um mineral fundamental para a atividade de GPx que é dependente de selênio, e a dieta com deficiência deste mineral detém a atividade desta enzima em peixes (Poston *et al.*, 1976; Bell *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1997).

A deficiência de selênio pode levar ao stresse oxidativo em órgãos (Gatlin *et al.*, 1986; Bell *et al.*, 1987), reduzir o crescimento (Wang e Lovell, 1997) e aumentar a mortalidade (Gatlin *et al.*, 1986; Bell *et al.*, 1987) em várias espécies de peixes. Os principais efeitos da toxicidade do selênio são o crescimento reduzido, baixa eficiência alimentar e elevada mortalidade. Assim, é de elevada importância que este mineral seja suplementado na dieta de peixes em estado de desenvolvimento.

#### **2.4. Suplementos vitamínicos na dieta de larvas de peixes marinhos**

Os estadios larvares dos peixes são considerados períodos muito sensíveis para a sua futura aptidão e, como tal, qualquer situação stressante causada por fatores externos torna os organismos mais suscetíveis à doença, a uma taxa de sobrevivência reduzida, a um menor crescimento e a um baixo sucesso reprodutivo em várias espécies de peixes (Solé *et al.*, 2004). Além disso durante o período larvar, as elevadas taxas de crescimento e diferenciação pressupõem um forte metabolismo celular e, por conseguinte, ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Costantini, 2014; Smith *et al.*, 2016). Essas moléculas instáveis se não forem neutralizadas por antioxidantes, oxidam proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, causando danos e, portanto, um estado de stress oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Os organismos podem atenuar o stress oxidativo por meio do aumento da ingestão de antioxidantes na dieta. Estes distribuem-se de maneira diferente entre os tecidos, dependendo das propriedades químicas (lipofílicas ou hidrofílicas) do antioxidante e das exigências específicas de um determinado tecido (Surai, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2015).

Tendo em conta que os indivíduos em crescimento apresentam um mecanismo endógeno de antioxidantes que ainda não está completamente maduro, os antioxidantes dietéticos podem ser particularmente importantes para o seu crescimento (Surai, 2002; Costantini, 2014).

Em muitas espécies de vertebrados, há uma maior dependência de antioxidantes não enzimáticos (como as vitaminas) em estádios iniciais de desenvolvimento, como aqueles adquiridos da dieta ou da progenitora (Surai, 2002; Costantini, 2014). Portanto, a suplementação de alimentos para peixes marinhos com antioxidantes em nível adequado à exigência nutricional de cada espécie, é de primordial importância, a fim de eliminar os efeitos drásticos das ROS e manter a função fisiológica normal do peixe (Navarro *et al.*, 2009; Maurenente, 2016).

Assim, suplementos alimentares, como as vitaminas, estão a tornar-se cada vez mais usuais na modulação da resposta fisiológica contra o stress, a fim de manter a homeostase celular em larvas de peixes marinhos. Tem sido demonstrado que peixes alimentados com dietas suplementadas com vitamina C têm maior capacidade de lidar com condições stressantes como o stress oxidativo (Ishibashi *et al.*, 1992; Henrique *et al.*, 1998). Deste modo, sendo as vitaminas importantes antioxidantes, estas devem ser suplementadas na dieta, pois os animais aquáticos não são capazes de as sintetizar em quantidade suficiente (Navarro *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2010; Junior *et al.*, 2015).

Portanto, escolher os nutrientes utilizados na confecção das dietas, considerando a sua composição de vitaminas, poderá refletir num melhor desempenho na proteção contra as ROS e por conseguinte num melhor desenvolvimento do peixe (Luquet e Watanabe, 1986, Navarro *et al.*, 2009).

## **2.5. Stress Oxidativo**

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Valko *et al.*, 2007).

No meio aquático, os organismos marinhos equilibram a produção de ROS com uma grande variedade de defesas antioxidantes celulares, que servem para desintoxicar os radicais livres (Di Giulio *et al.*, 1989). Em concentrações baixas ou moderadas, os ROS podem ser benéficos para a célula, estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (Fridovich, 1999; Droge, 2002).

No entanto, quando a produção de ROS excede a sua remoção por essas defesas e os mecanismos de proteção falham após a exposição ao stress ambiental, ocorre stress oxidativo (Vinagre *et al.*, 2012), responsável pelo dano oxidativo ao DNA e aos lípidos, inativação enzimática e degradação estrutural das proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Como consequência, os organismos podem limitar a energia disponível, e o crescimento, a motilidade, a ingestão e a digestão podem sofrer vários distúrbios funcionais, levando a alterações ao desenvolvimento (Hochachka e Somero, 2002).

### 2.5.1. Peroxidação Lipídica

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais. Como a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares existentes na membrana mitocondrial interna, a formação de ROS ocorre perto da membrana. Assim, as ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres. Deste modo, por consequência do stress oxidativo gerado, ocorre o fenómeno da peroxidação lipídica (LPO) no qual se dá a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados (Mehrotra *et al.*, 1991).

Os peixes e, principalmente, as larvas de peixes marinhos, contêm grandes concentrações de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e, como tal, apresentam elevado risco de sofrer danos nos tecidos resultantes da peroxidação lipídica (Hsieh e Kinsella, 1989; Matés, 2000; Zengin e Akpınar, 2006; Kiron *et al.*, 2011).

A peroxidação lipídica é precedida por uma série de reações em cadeia e, no caso do ciclo redox, demonstra a habilidade de um único radical livre de oxigénio em propagar um número de reações bioquímicas com efeitos danosos (Erdelmeier *et al.*, 1998). Este fenómeno começa normalmente com a extração de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido, por intermédio da ação de uma espécie reativa como o OH<sup>•</sup> ou o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando-se um radical lipídico (L<sup>•</sup>). Este ataque é seguido pela adição de uma molécula de O<sub>2</sub> formando-se um radical peróxilo (LOO<sup>•</sup>). Se este radical não for neutralizado pelas defesas antioxidantes, vai rapidamente desencadear um fenómeno de propagação da peroxidação lipídica reagindo com outros lípidos adjacentes e formando hidroperóxido lipídico (LOOH). Estes compostos podem facilmente ser decompostos para formar novamente radicais L<sup>•</sup>. Esta série de reações de peroxidação lipídica iniciada pelas ROS, com a produção de radicais peróxilos e lipídicos, são coletivamente designadas por reações de propagação em cadeia e, se não forem travadas, podem provocar danos potencialmente muito superiores aos ROS que iniciaram a reação. A mitocôndria é então um local sensível à ação destrutiva dos ROS, embora seja um dos locais da célula onde também existe um maior número de defesas antioxidantes (Fridovich, 1999; McCord, 2000).

A degradação dos peróxidos de ácidos gordos polinsaturados geram malondialdeído (MDA) e aldeídos tóxicos (2E)-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). O grau de peroxidação lipídica é então determinado através da medição das concentrações de MDA e 4-HNE, sendo os seus produtos usados como medida do stress oxidativo (Erdelmeier *et al.*, 1998).

## **2.6. *Dicentrarchus labrax***

Em condições naturais, é relatado que esta espécie eurialina passa fases embrionárias e larvais em ambientes marinhos (salinidade de 38‰) antes da migração de juvenis para zonas costeiras, estuários e lagoas (Jennings e Pawson, 1992; Varsamos *et al.*, 2002), onde as condições de salinidade podem variar muito de ambientes hipersalinos (até 40‰) para água doce (0,17‰).

O robalo adulto reproduz-se sexualmente usando fertilização externa e apenas uma vez por ano. A época de reprodução ocorre no inverno na população mediterrânea (dezembro a março) e até junho nas populações do Atlântico. O robalo desova pequenos ovos pelágicos (1,02-1,39 mm) em águas com salinidades inferiores a 35 ‰, perto das fozes e estuários dos rios ou nas áreas litorais onde a salinidade é elevada ( $\geq 30$  ‰) (Moretti *et al.*, 1999; Stickney, 2000).

Os ovos de robalo são planctónicos e eclodem entre 4 e 9 dias após a fertilização, dependente da temperatura do mar. Durante os seguintes 2 a 3 meses, as larvas crescentes derivam do mar aberto em direção à costa e, eventualmente, em riachos e estuários. Estes habitats protegidos são utilizados pelos robalos juvenis durante os próximos 4-5 anos antes de amadurecerem e adotarem os movimentos migratórios dos adultos (Pickett e Pawson, 1994).

Não sendo particularmente sensíveis à baixa temperatura, alguns peixes podem passar o inverno em lagoas costeiras, em vez de voltarem para o mar aberto. Como tal, a temperatura fornece uma dica importante para a iniciação e localização da desova. Os robalos europeus sendo euritérmicos (Moretti *et al.*, 1999; Stickney, 2000) podem ser encontrados em zonas onde a água ronda temperaturas de 8,5-9,0°C e em águas mais quentes com uma temperatura de 15°C (Pickett e Pawson, 1994).

Depois de terem absorvido o respetivo saco vitelino, 6 dias após a eclosão, as larvas recebem uma alimentação muito específica, constituída numa primeira fase por microalgas e rotíferos (um zooplâncton microscópico) e, quando atinge o tamanho apropriado, é-lhes fornecido Artémia (um pequeno crustáceo que vive em lagoas, deltas e estuários). Estes

alimentos são sempre produzidos em maternidades, na estação de produção. Após 40 a 50 dias, as larvas são transferidas para uma unidade de desmame onde são progressivamente submetidas a uma alimentação muito rica em proteínas, essencialmente à base de óleo e farinha de peixe. Administrada sob a forma de granulados, esta alimentação é muito próxima da alimentação do robalo durante o restante período de criação. Esta dieta rica em proteínas, a par da qualidade da água, assegura o máximo crescimento e sobrevivência das larvas durante estes primeiros meses cruciais. Os alevins são transferidos, 3 a 4 semanas mais tarde, para a unidade de criação de juvenis. São então alimentados com granulados durante cerca de dois meses, sendo posteriormente transferidos para uma exploração de engorda.

O robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Moronidae, Perciformes), é uma espécie que representa uma elevada importância ecológica e económica nas águas costeiras do Oceano Atlântico e em todo o mar Mediterrâneo e no Mar Negro (Wheeler, 1975; Haffray *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2009).

Apesar de ser uma das espécies mais exploradas para fins de aquacultura no sul da Europa (Lamari *et al.*, 2016), o robalo é muito suscetível a stressores e patógenos, o que ocasionalmente causa algumas grandes perdas durante a sua produção em aquacultura (Izquierdo, 2005). Tendo isso em consideração, algumas medidas podem ser tomadas para compensar ou evitar os possíveis danos ocasionados durante o seu cultivo, como a suplementação de alimentos com antioxidantes.

O robalo Europeu tem sido usado anteriormente como espécie sentinela em estudos de monitoramento e ensaios ecotoxicológicos (Giari *et al.*, 2007), incluindo a avaliação de respostas relacionadas ao stress oxidativo (Ahmad *et al.*, 2009; Maria *et al.*, 2009; Vinagre *et al.*, 2012). Além disso, estudos anteriores demonstraram que as larvas de peixes marinhos como as de robalo, constituem um modelo animal muito interessante para estudar as interações entre nutrientes (nutrição exógena) e os processos de desenvolvimento. Por exemplo, Zambonino-Infante *et al.*, (2008), avaliaram a substituição completa de alimentos vivos por dietas inertes em larvas de robalo, que é um dos principais objetivos da aquacultura.

## 2.7. Objetivos do estudo

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade das enzimas do stress oxidativo em pós-larvas de robalo *Dicentrarchus labrax* alimentadas com dietas com diferentes formulações vitamínicas.

Para cumprir este objetivo, foram desenvolvidos os seguintes passos:

- a) Produção do cultivo larvar;
- b) Otimização de protocolos das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx e SeGPx) para avaliar o stress oxidativo em larvas de peixes marinhos;
- c) Dissecção das pós-larvas para obtenção dos fígados, nos quais se avaliou o potencial antioxidante, analisando a atividade das enzimas do stress oxidativo e o dano oxidativo provocado pela peroxidação lipídica.

Este trabalho visa fornecer soluções mais económicas na formulação de dietas, de forma a poder analisar o efeito de ingredientes novos e mais rentáveis na saúde de larvas de peixes marinhos, com a finalidade de manter a qualidade das dietas na criação destes organismos tão vulneráveis.



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Condições do Cultivo Larvar**

As pós-larvas de robalo (*D. labrax*) foram obtidas de reprodutores mantidos em cativeiro na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Quando recém-eclodidas, foram cultivadas até 30 dias após a eclosão (DAE) num tanque de 1,5m<sup>3</sup> com uma densidade inicial de 60 larvas/L.

Estas larvas foram mantidas no escuro durante 24h até ao dia 9 após a eclosão (DAE). A partir deste, o cultivo foi mantido num fotoperíodo de 18h luz e 6h escuro. Durante todo o período de cultivo, as larvas foram mantidas a uma temperatura de 19°C e com uma salinidade de 36 PSU.

Após esta idade as larvas foram alimentadas com *Artemia* sp, sendo o tamanho da presa ajustado de acordo com o desenvolvimento larval e condição experimental. Dessa forma, a partir dos 9 DAE e até aos 19 DAE, o alimento vivo foi fornecido de igual modo para todos os tratamentos. Entre os 24 DAE e os 30 DAE procedeu-se à adaptação ao alimento inerte, com o decréscimo da quantidade de Artémia e introdução gradual e crescente da quantidade da microdieta inerte (Winfast, SPAROS).

As estirpes de Artémia usadas foram *Artemia nauplii* (AF de INVE, Bélgica) e *Artemia metanauplii* (EG) enriquecida com RedPepper (Bernaqua, Bélgica). A alimentação diária das presas vivas foi dividida por 4 a 5 refeições, com quantidade ajustada para garantir uma densidade ótima de presas.

#### **3.2. Condições experimentais**

Aos 31 DAE as larvas foram transferidas e distribuídas aleatoriamente por 9 tanques cilíndricos de 300L com uma densidade inicial de 15 larvas/L (4500 larvas/tanque). Durante 39 dias (31 DAE – 70 DAE) as larvas foram alimentadas com três dietas experimentais diferentes (A, B e C) que foram testadas em triplicado. As dietas foram formuladas e produzidas pela SPAROS, para conter diferentes formulações de vitaminas. A dieta B, dieta controlo, mantém níveis de vitamina semelhantes a uma dieta controlo.

O alimento inerte foi fornecido às larvas entre as 08:00 e as 02:00 a intervalos de 1 hora, usando alimentadores automáticos. A quantidade de alimento inerte foi ajustada durante o ensaio experimental, com base em observações de crescimento dos peixes, qualidade da água

e limpeza do tanque. O crescimento e a sobrevivência foram monitorizados ao longo do ensaio.

No final do período experimental (70 DAE) o desempenho do crescimento foi determinado de acordo com as medidas de peso seco e comprimento total. Para tal, foram recolhidas por cada tanque 50 pós-larvas que foram fotografadas e medidas usando a lupa ótica (Nikon SMZ1000), o ecrã (Nikon Digital Sight DS-L3) e a câmara (Nikon DS-Fi2). As mesmas foram posteriormente lavadas em água destilada e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem liofilizadas. Após este processo, procedeu-se à determinação do seu peso seco.

Para a análise do stress oxidativo, aos 70 DAE, foram também recolhidas 30 pós-larvas por tanque. A recolha das amostras de pós-larvas foi feita com manuseamento rápido devido à vulnerabilidade que estes organismos apresentam. As larvas foram imediatamente colocadas em azoto líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise bioquímica.



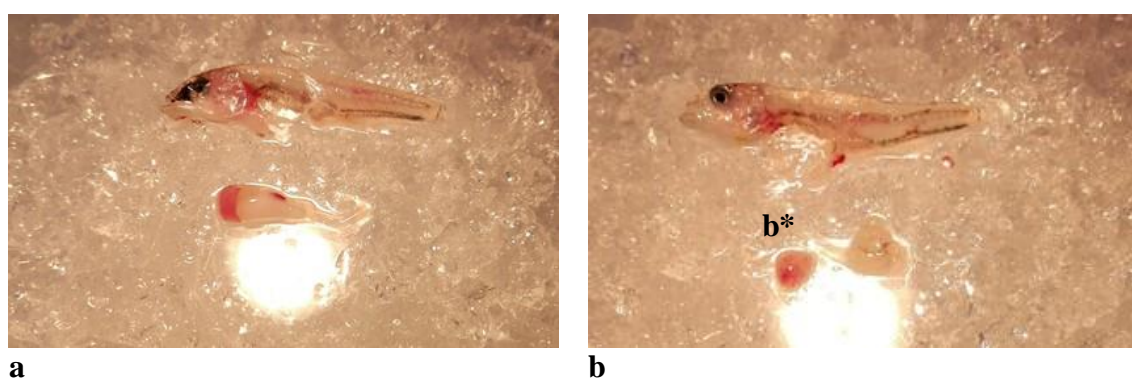
**Figura 1.** Sistemas de cultivo larvar da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, onde se realizou o ensaio de nutrição com as pós-larvas de robalo, *Dicentrarchus labrax*, (volume dos tanques 300L).

### 3.3. Preparação dos tecidos para determinações bioquímicas

Utilizou-se apenas o fígado para determinação da atividade das enzimas de stress oxidativo. Assim, as pós-larvas de robalo foram dissecadas em vidro mantido a  $0^{\circ}\text{C}$  e, com o auxílio da lupa foi possível recolher as amostras de fígados de cada pós-larva. Tendo em conta que se trata de uma análise enzimática, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem processadas, para que as enzimas presentes nos órgãos não se degradem e decomponham.



**Figura 2.** Dissecação de uma pós-larva de robalo *Dicentrarchus labrax*, em vidro e mantida a 0°C.



**Figura 3.** Recolha dos órgãos da cavidade abdominal (a) para obtenção dos fígados das pós-larva de robalo *Dicentrarchus labrax* (b\*).

De forma a otimizar as técnicas para determinação das atividades das enzimas de stress oxidativo no fígado, realizou-se um trabalho prévio com base na bibliografia existente para definir o tampão, o volume de homogeneização assim como as condições da análise (temperatura, volume da alíquota) antes de serem utilizadas as amostras do ensaio.

As amostras de fígado de robalo, foram homogeneizadas em tampão fosfato salino (PBS) com um pH de 7,4 (1g de tecido/15mL de tampão), utilizando o homogeneizador (IKA T25 digital Ultra Turrax). A proporção entre o peso da amostra e o volume de tampão foi ajustada para obter um teor de proteína adequado para determinações bioquímicas adicionais. As determinações analíticas foram realizadas ao sobrenadante resultante de uma centrifugação (Z 383K Hermle) de 13 500g, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi dividido em alíquotas e armazenado a -80°C para medições adicionais da quantificação total da proteína, peroxidação lipídica e medição das atividades SOD, CAT, GPx e SeGPx. Todas as etapas foram realizadas em gelo para evitar a degradação enzimática.

Todas as medições espectrofotométricas foram feitas num leitor de microplacas de espectro contínuo e temperatura controlada (Multiskan Go, Fisher Scientific).



**Figura 4.** Homogeneização dos fígados recolhidos de cada pós-larva de robalo *Dicentrarchus labrax* utilizando o homogeneizador IKA T25 digital Ultra Turrax.

### **3.4. Determinações Bioquímicas**

#### **3.4.1. Quantificação da Proteína**

Os resultados das enzimas foram normalizados determinando o teor de proteína das amostras de acordo com o método de Bradford, utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão (Bradford, 1976). Em cada poço da microplaca foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de cada padrão, 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra (e a água), juntamente com 160  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford a todos os poços. Análises em triplicados. Após 1 minuto de agitação e de aguardar 2 minutos na escuridão, a absorvância foi medida a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL.

#### **3.4.2. Enzimas antioxidantes**

##### **3.4.2.1. Superóxido Dismutase**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida através do decréscimo na formação do NBT que normalmente ocorre através da redução do radical anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), gerado pela reação da xantina oxidase/xantina. Com o intuito de se proceder a esta análise, adicionou-se a uma microplaca 40  $\mu\text{L}$  de tampão SOD que continha 50 mM de Tampão Fosfato e 0,1 mM de EDTA (pH 7,8), 10  $\mu\text{L}$  de amostra, 200  $\mu\text{L}$  da solução de

xantina com NBT a 0,75 mM em tampão fosfato a 50mM. Por último adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da enzima xantina oxidase a 0,1  $\text{U mL}^{-1}$  para que dessa forma se desse início à reação que foi monitorizada a 550nm, durante 10 minutos com intervalos de 20 segundos. O conteúdo de SOD ( $\text{U mL}^{-1}$ ) foi determinado por regressão linear da curva padrão, ou seja, as unidades SOD foram determinadas usando uma curva padrão de 0 a 40 unidades SOD  $\text{mL}^{-1}$ . Os resultados finais referentes à atividade enzimática da SOD foram normalizados pelo teor de proteína total e expressos em  $\text{U mg}^{-1}$  de proteína total.

#### **3.4.2.2. Catalase**

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada com base no consumo do peróxido de hidrogénio (substrato) observado pela diminuição linear ao longo do tempo da absorvância a 240nm, de acordo com o método de Beers e Sizer (1952), sendo validada para microplacas por Li e Schellhorn (2007).

O volume total de reação foi de 265  $\mu\text{L}$ , composto por 50mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 40 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como substrato. A reação deu início aquando da adição de 10  $\mu\text{L}$  de amostra. O consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi monitorizado a cada 30 segundos por 5 minutos, a 240 nm e 25°C. O coeficiente de extinção molecular de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. A atividade da catalase foi ainda avaliada através da Azida de Sódio, substância que inibe a atividade desta enzima antioxidante. Desta forma, é possível verificar que outros fatores podem influenciar a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta análise permitiu assim, verificar que o decréscimo da absorvância foi da responsabilidade da catalase e não de outra substância endógena. O protocolo da reação foi validado através da utilização de um padrão de catalase ( $12852 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína) a diferentes concentrações. O padrão CAT foi medido usando uma suspensão aquosa de catalase proveniente de fígado de bovino.

#### **3.4.2.3. Glutationa Peroxidase**

As atividades da glutathione peroxidase Selénio-independente (GPx) e da glutathione peroxidase Selénio-dependente (SeGPx) foram avaliadas espectralmente por ensaio acoplado com glutathione reductase (Flohé e Günzler, 1984). O peróxido de hidrogénio e o hidroperóxido de cumeno foram os substratos usados para analisar a atividade da SeGPx

e da GPx, respetivamente, seguindo a diminuição da taxa de oxidação de NADPH consumido durante a reeformação de GSH a partir de GSSG.

Como procedimento, preparou-se o tampão de ensaio (50 mM de tampão fosfato a pH 7,6, 0,1 mM de EDTA e 0,15 mM de solução azide de sódio) ao qual foi posteriormente adicionado cada substrato (1,25 mM de Peróxido de Hidrogénio e 1 mM de Cumene Hidroperóxido). Assim, de forma a preparar-se cada substrato para as atividades SeGPx e GPx total, adicionou-se 6,38  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogénio (30%) a 50 mL de tampão de ensaio e 9,26  $\mu\text{L}$  de Cumene hidroperóxido (80%) aos mesmos 50 mL de tampão de ensaio. Preparou-se ainda uma mistura de reação base que consistiu em 0,01844 g de GSH a 3 mM, 0,00572 g de NADPH a 0,25 mM e 0,268 g de GR a 0,67  $\text{U mL}^{-1}$ , que foram adicionados a 20 mL de tampão de ensaio. Quer os substratos referentes às atividades de SeGPx e GPx, quer a mistura de reação base, foram incubados a 30°C antes da análise, propriamente dita.

Finalmente, afim de se determinar a atividade desta enzima, numa microplaca adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  da mistura de reação base, com 20  $\mu\text{L}$  de Tris-Sucrose nos respetivos poços em duplicado, para o branco. Para cada atividade (SeGPx e GPx) adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  da mistura de reação base e 20  $\mu\text{L}$  de amostra, também em duplicado. Levou-se a incubar a 28°C durante 2 minutos. Ao fim do tempo definido, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de cada substrato a cada branco e para cada atividade, para dar início à reação. A oxidação do NADPH foi registada espectrofotometricamente a 340nm, durante 5min a 25°C. A atividade enzimática da SeGPx foi calculada como  $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína e a da GPx foi calculada como  $\text{nmol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, usando um coeficiente de extinção molar de  $0.622 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.4.3. Peroxidação Lipídica

O método descrito para determinar o grau de peroxidação lipídica foi desenvolvido para medir as concentrações de MDA e 4-HNE (Erdelmeier *et al.*, 1998), e baseia-se na relação do reagente cromogénico 1-methyl-2-phenylindole ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}$ ), onde duas moles desse reagente ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}$ ) reagem com uma mole de tanto MDA como 4-HNE a 45°C durante 60 minutos, para formar um cromóforo estável com um máximo de absorvância a 586 nm.

Para a curva padrão, preparou-se as concentrações padrão a partir da solução mãe (solução de MDA) em microtubos *Eppendorf*.

Em microtubos *Eppendorf* de 1,5mL adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de cada concentração, em triplicado. Adicionou-se 650  $\mu\text{L}$  de reagente ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}$ ) diluído (primeiro dissolveu-se N-

methyl-2-phenylindole em acetonitrilo; esta solução foi posteriormente diluída em metanol) a cada microtubo e, agitou-se no vórtex. Adicionou-se 150 µL de reagente ácido metanosulfônico (CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S) a cada microtubo na *Hotte* e misturou-se bem com o tubo fechado. De seguida colocou-se a incubar a 45°C durante 60 minutos na estufa. Transferiu-se 200 µL do conteúdo dos microtubos para a microplaca e fez-se um branco com 200 µL de Tris-NaCl. A leitura foi feita então no leitor de microplacas num comprimento de onda de 586 nm. Paralelamente, o mesmo procedimento foi feito com 200 µL de cada amostra.

### **3.5. Análise Estatística**

Para avaliar os resultados referentes ao stress oxidativo em pós-larvas de robalo quando submetidas a três dietas experimentais diferentes com diferentes níveis de vitaminas, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) com um fator (Zar, 2010) e os testes Post-Hoc foram realizados para possível identificação das diferenças entre os tratamentos. Os resultados são apresentados sob a forma de média ± desvio padrão (DP). Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 (isto é, sempre que  $P < 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados mediante a utilização do software IBM SPSS Statistics 25.



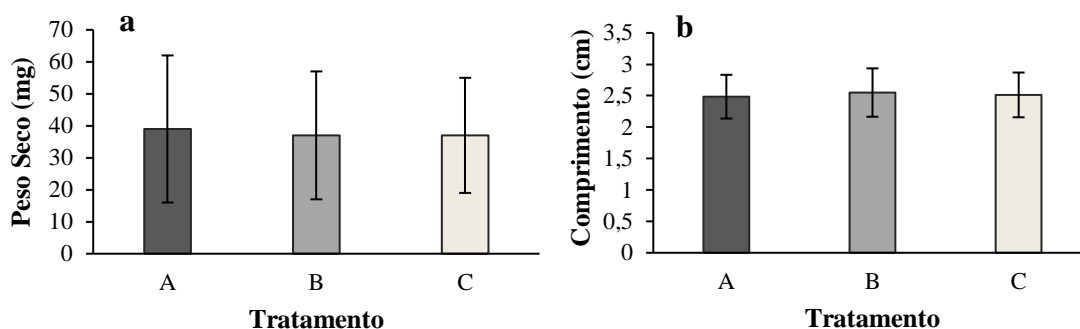
## 4. Resultados

### 4.1. Desempenho do crescimento larvar

O desempenho do crescimento das pós-larvas de robalo foi determinado através da medida do peso seco (mg) e do comprimento total (cm).

O comprimento total das pós-larvas aos 70 (DAE) foi de  $2,5 \pm 0,4$  cm,  $2,6 \pm 0,4$  cm e  $2,5 \pm 0,4$  cm nas dietas A, B e C, respectivamente. O peso seco foi de  $39 \pm 23$  mg,  $37 \pm 20$  mg e  $37 \pm 18$  mg nas dietas A, B e C, respectivamente.

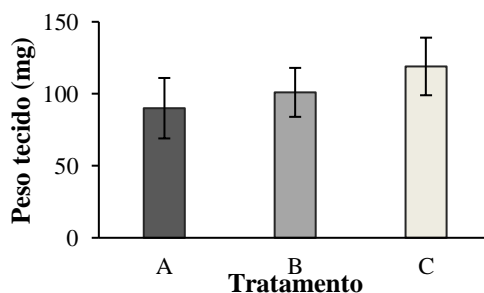
No final do ensaio as pós-larvas de robalo alimentadas com as diferentes dietas experimentais, apresentaram um crescimento similar entre os tratamentos, revelando que não houve diferenças estatisticamente significativas no crescimento ( $P > 0,05$ ), (Figura 5).



**Figura 5.** Variação do peso seco (a) e do comprimento total (b) das pós-larvas de *Dicentrarchus labrax* quando alimentadas com três tipos de dietas experimentais (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 50).

### 4.2. Peso dos fígados

Os resultados relativos aos pesos dos fígados dissecados, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de dieta (Figura 6).



**Figura 6.** Comparação do peso dos fígados de pós-larvas de *Dicentrarchus labrax*, (o valor de cada tanque corresponde a um *pool* de 30 fígados) alimentadas com dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 3).

### 4.3. Efeito da dieta na resposta ao stress oxidativo

#### 4.3.1. Enzimas antioxidantes

A análise de variância com um fator (ANOVA) indicou que não existe um efeito significativo ( $P>0,05$ ) dos três tipos de dieta na atividade específica das enzimas antioxidantes GPx, SOD e CAT. Pelo contrário, a atividade específica da enzima antioxidante SeGPx mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

Os resultados referentes às atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e SeGPx) e ao dano oxidativo causado pela peroxidação lipídica (LPO), estão apresentados na Tabela I.

**Tabela I** – Efeito das três dietas experimentais (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas nas enzimas antioxidantes (SOD, CAT, SeGPx e GPx) e na peroxidação lipídica (LPO) do fígado das pós-larvas de robalo *Dicentrarchus labrax*. As diferentes letras (a, b) representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para a mesma análise (ANOVA de um fator,  $P<0,05$ ).

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
SOD (U/mg proteína)	8,40±1,15	9,03±1,75	10,48±1,61
CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ /min/mg proteína)	2,38x10 <sup>3</sup> ±3,63x10 <sup>3</sup>	1,87x10 <sup>2</sup> ±9,51x10	1,08x10 <sup>3</sup> ±9,81x10 <sup>2</sup>
SeGPx ( $\mu\text{mol/min/mg}$ proteína)	0,13±0,09 <sup>a</sup>	0,07±0,06 <sup>a</sup>	1,25±0,84 <sup>b</sup>
GPx (nmol/min/mg proteína)	6,61x10 <sup>3</sup> ±2,35x10 <sup>3</sup>	6,86x10 <sup>3</sup> ±5,84x10 <sup>3</sup>	8,18x10 <sup>3</sup> ±7,99x10 <sup>3</sup>
LPO (nmol MDA/g tecido)	32,28±2,34	26,45±4,64	28,81±2,65

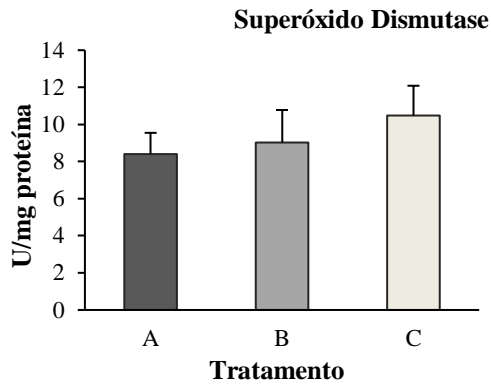
O grupo de pós-larvas que foram alimentadas com a dieta C exibiram aparentemente uma maior atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e SeGPx) em relação aos tratamentos com a dieta A e B.

Quando alimentadas com a dieta C, as pós-larvas de robalo apresentaram aparentemente cerca de mais 20% de atividade de SOD do que o grupo de pós-larvas sujeitas ao tratamento com a dieta A. Quando comparado com o grupo de pós-larvas alimentadas com a dieta B, a atividade da SOD aumentou aparentemente em cerca de 14% com a dieta C (Figura 7).

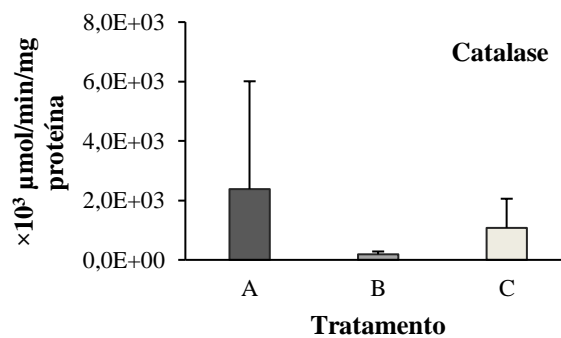
A atividade da GPx nos fígados das pós-larvas foi significativamente maior com a dieta C do que com a dieta A e B, exibindo um aumento de cerca de 90% a 94%, respectivamente, de atividade em relação a estes dois tratamentos (Figura 9).

As pós-larvas do grupo de dieta C apresentaram aparentemente um aumento de cerca de 19% e 16% na atividade da SeGPx em relação aos fígados dos grupos da dieta A e B, respectivamente (Figura 9).

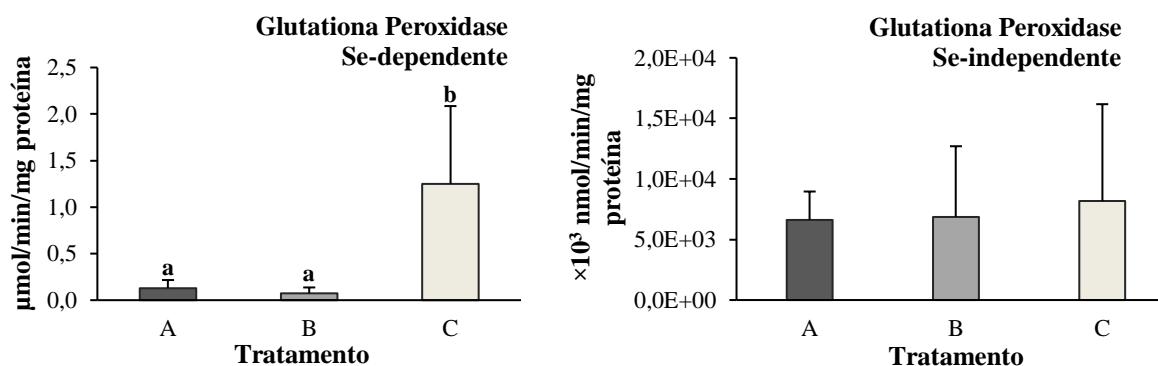
Relativamente à atividade da CAT, verificou-se o oposto nas pós-larvas quando alimentadas com a dieta C, pois estas apresentaram uma tendência para diminuir a atividade desta enzima antioxidante com esse tratamento do que quando alimentadas com a dieta A, cuja atividade foi aparentemente maior. As pós-larvas quando alimentadas com a dieta B exibiram aparentemente uma reduzida atividade desta enzima quando comparada com as pós-larvas alimentadas com a dieta A e C (Figura 8). Como demonstrado na Tabela I, a atividade da CAT tendencialmente aumentou cerca de 55% no grupo das pós-larvas alimentadas com a dieta A quando comparado com as pós-larvas da dieta C. Com a dieta B, os fígados das pós-larvas exibiram um aparente aumento de aproximadamente 83% em relação à dieta C. Comparando com a dieta A, a dieta B gerou um aparente decréscimo de cerca de 92% de atividade de CAT.



**Figura 7.** Atividade da enzima Superóxido Dismutase nos fígados de pós-larvas de *Dicentrarchus labrax* quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num *pool* de 30 fígados.



**Figura 8.** Atividade da enzima Catalase nos fígados de pós-larvas de *Dicentrarchus labrax* quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num *pool* de 30 fígados.

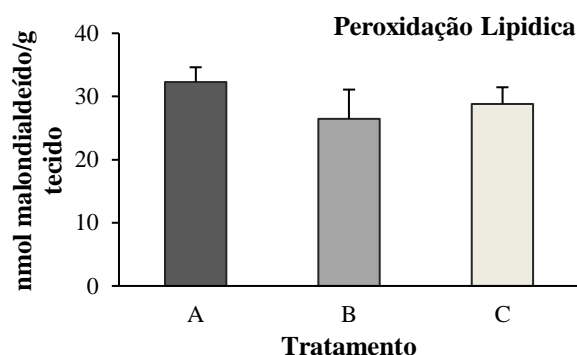


**Figura 9.** Atividade das enzimas Glutathione Peroxidase Se-dependente (SeGPx) e Glutathione Peroxidase Se-independente (GPx) nos fígados de pós-larvas de *Dicentrarchus labrax* quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. As diferentes letras (a, b) representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para a mesma análise (ANOVA de um fator,  $P < 0,05$ ). Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 3). Cada replicado consiste num *pool* de 30 fígados.

### 4.3.2. Dano Oxidativo

De acordo com os valores médios de MDA, analisados para avaliar a peroxidação lipídica, as pós-larvas de robalo aparentemente apresentaram menores níveis de MDA para a dieta B ( $26,45 \pm 4,64$  nmol MDA/g tecido) do que para a dieta A ( $32,28 \pm 2,34$  nmol MDA/g tecido), que foi a que apresentou níveis de MDA tendencialmente maiores. O tratamento com a dieta C ( $28,81 \pm 2,65$  nmol MDA/g tecido), resultou num dano lipídico aparentemente menor quando comparado com a dieta A, mas comparado com a dieta B, os níveis de MDA foram aparentemente maiores quando as pós-larvas foram alimentadas com a dieta C.

No entanto, a análise de variância com um fator (ANOVA) indicou que não existe um efeito significativo ( $P > 0,05$ ) no dano oxidativo causado pela peroxidação lipídica.



**Figura 10.** Peroxidação Lipídica nos fígados de pós-larvas de *Dicentrarchus labrax* quando alimentadas com três tipos de dietas (A, B e C) com diferentes formulações de vitaminas. Os resultados estão apresentados sob a forma de Média  $\pm$  Desvio Padrão ( $n = 3$ ). Cada replicado consiste num *pool* de 30 fígados.



## 5. Discussão

A produção de peixes de elevada qualidade é um dos fatores chave para o crescimento sustentável da indústria da aquicultura. Como tal, muitas empresas têm-se dedicado à otimização de dietas inertes para larvas de peixes marinhos, utilizando fórmulas mais económicas e que lhes garantam uma melhor sobrevivência e crescimento. Tendo isto em consideração, o presente estudo pretendeu avaliar se o efeito de dietas experimentais com formulações vitamínicas mais económicas, fossem mais rentáveis e melhorassem o desempenho do crescimento e da defesa antioxidante contra o stress oxidativo em pós-larvas de robalo *Dicentrarchus labrax*.

O crescimento é dos parâmetros mais afetados quando as formulações da dieta não são corretas e/ou não incluem os níveis exigidos dos diferentes nutrientes. Mediante os dados obtidos relativos ao crescimento, o efeito das formulações vitamínicas, presentes nas dietas experimentais (A e C), não mostrou diferenças estatisticamente significativas quando comparadas à dieta controlo (B), indicando que as novas formulações usadas pela empresa não afetaram o crescimento das pós-larvas de robalo. O crescimento do robalo mostrou assim ser semelhante para as diferentes dietas, indicando que a formulação das dietas experimentais assegurou o crescimento idêntico ao da dieta controlo. Estudos anteriores revelaram que a suplementação de elevados níveis de vitamina E nas microdietas em espécies de peixes como a dourada e o robalo melhoraram significativamente o crescimento e a resistência ao stress (Betancor *et al.*, 2009). Outros autores como Costantini *et al.*, 2018, concluíram que a suplementação de antioxidantes na dieta favoreceu o crescimento em juvenis de robalo após um período de privação alimentar.

Do ponto de vista prático, embora os níveis nutricionais possam ser altos o suficiente na dieta para cobrir as necessidades de manutenção e crescimento dos organismos, estes podem ser insuficientes para promover resistência ao stress em larvas de peixes (Kolkovski, 2009). Como tal, sendo o período larvar altamente exigente na absorção de energia e oxigénio, um excesso de produção de ROS pode ocorrer e a influência de um estado nutricional deficiente pode levar ao aumento do stress oxidativo (Dandapat *et al.*, 2003; Rueda-Jasso *et al.*, 2004; Solé *et al.*, 2004; Hachero-Cruzado *et al.*, 2014).

A primeira linha do mecanismo de defesa antioxidante contra a produção excessiva de ROS envolve as enzimas SOD e CAT (Deyashi e Chakraborty, 2016), que devem aumentar as suas atividades sob condições de stress oxidativo. No presente estudo, nenhum efeito

significativo foi observado na atividade destas duas enzimas antioxidantes quando as pós-larvas foram alimentadas com as dietas experimentais. Apesar de não serem significativos e por isso não evidenciarem qualquer efeito das dietas nas pós-larvas para estas duas enzimas, os resultados médios relativos à sua atividade antioxidante mostram que as atividades de ambas são indiretamente proporcionais. Enquanto que a SOD apresentou uma tendência aparente para reduzir e aumentar os valores de atividade quando as pós-larvas foram alimentadas com a dieta A e C, respectivamente, a CAT exibiu um aparente aumento e diminuição de atividade para o grupo de pós-larvas da dieta A e C, respectivamente. A SOD catalisa a dismutação do anião superóxido gerado pelas mitocôndrias em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2015). A CAT catalisa a decomposição do  $H_2O_2$ , formado pela ação da SOD, em  $H_2O$  e  $O_2$ . Como tal, o padrão de comportamento de ambas as enzimas deveria ser idêntico, uma vez que estas têm funções relacionadas, na medida em que a SOD convertendo superóxido em peróxido de hidrogénio fornece substrato para a CAT (Monteiro *et al.*, 2006). Realmente os resultados de Tocher *et al.*, (2002), em termos de notável atividade antioxidante das enzimas CAT e SOD, indicaram que diante uma alimentação suplementada com níveis elevados de vitamina E, a espécie *Sparus aurata* apresentou uma diminuição de atividade destas duas enzimas antioxidantes. Assim, uma tendência para reduzir a atividade da SOD no grupo das pós-larvas da dieta A, pode ser indicativa de uma necessidade decrescente de desintoxicar o radical superóxido. Enquanto o aumento aparente da SOD pode ser uma consequência dos radicais livres derivados da oxidação de lípidos (Zhang et al, 2009). O aparente aumento e a aparente redução da atividade da CAT, nas pós-larvas do grupo de dieta A e C, respectivamente, pode ter sido compensada pela diminuição e pelo aumento na atividade de outras enzimas antioxidantes como o grupo das selenoproteínas, a SeGPx e a GPx (Ramírez-Duarte *et al.*, 2016).

A GPx é uma enzima que contém selénio no seu sítio ativo e é responsável pela redução dos peróxidos (hidroperóxidos, lipoperóxidos e, assim como a catalase, o  $H_2O_2$ ), utilizando glutathiona (GSH) reduzida como substrato doador de eletrão, transformando-a em glutathiona oxidada (GSSG). Uma vez oxidada, a GSSG é convertida em GSH pela glutathiona redutase (GR) (Kinnula, 2005). Neste trabalho, a atividade da SeGPx foi significativamente maior nas pós-larvas alimentadas com a dieta C do que com as dietas A e B. Apesar de não serem significativos, os resultados da atividade da GPx apresentaram também um aparente aumento da atividade nas pós-larvas alimentadas com a dieta C. Vários estudos também sugeriram um aumento da atividade da GPx em larvas de *Lates calcarifer* alimentadas com

*Artemia nauplii* (Kalaimani *et al.*, 2008) e em pós-larva de *Scophthalmus maximus* durante o seu desenvolvimento larvar (Peters e Livingstone, 1996). O aumento da atividade destas duas enzimas antioxidantes, aquando da alimentação com a dieta C, pode ter sido uma resposta a fortes alterações metabólicas, como a metamorfose, ocorridas durante o período experimental (31 DAE – 70 DAE), resultando num aumento do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipoperóxidos (Solé *et al.*, 2004). Estas observações indicam uma necessidade progressiva de remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos lipídicos das pós-larvas de robalo, por parte da enzima glutaciona peroxidase. Além disso, pode ser devido à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causada pela dismutação de radical anião superóxido, uma vez que a atividade da SOD teve um aparente aumento e a da CAT aparentemente diminuiu, como visto para o grupo da dieta C. A CAT tem apenas afinidade por moléculas de baixo peso molecular, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não metabolizando moléculas como os peróxidos lipídicos. Atua de forma complementar ao sistema antioxidante das glutionas, sendo mais eficiente que este com elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Comhair e Erzurum, 2002). Provavelmente a formulação da dieta C não causou elevadas produções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Daí possivelmente a CAT ter tido valores de atividade aparentemente menores que a GPx, para esse tratamento.

Tendo em conta que a glutaciona peroxidase possui atividade enzimática relacionada com os níveis de selénio nos tecidos (Rowntree, 2004), a deficiência desse elemento leva à diminuição da atividade da GPx. É possível então que o grupo das pós-larvas das dietas A e B, contenham baixos níveis de selénio nos seus tecidos. Esse elemento tem sido associado a severas alterações no metabolismo celular e atua sobre a integridade das membranas e na proteção contra a degeneração oxidativa dos tecidos (Rover, 2001).

Se o padrão de atividade das enzimas antioxidantes analisadas no presente estudo é semelhante, então pode significar que as dietas experimentais, com formulações vitamínicas mais baratas que a dieta controlo, não afetaram o sistema antioxidante das pós-larvas de robalo. Isso pode indicar uma notável propriedade de eliminação de radicais livres das vitaminas presentes nas dietas estudadas. O possível aumento ou diminuição visto pelos valores médios de atividade das enzimas, pode ter-se devido ao sistema de defesa antioxidante endógeno. Uma possível justificação para o aumento de tais enzimas, pode dever-se ao facto de durante o período experimental, devido às fortes alterações no nível do desenvolvimento das pós-larvas, haver um excesso de radicais livres produzidos que de certo modo inativam as enzimas antioxidantes a neutralizar ou eliminar os mesmos. O aumento nas atividades mais importantes das enzimas antioxidantes em larvas alimentadas pode ainda

ser explicado pelo nível crescente de reações mediadas por radicais livres induzidas no peixe após a absorção do saco vitelino sob os efeitos de fatores como o comportamento alimentar, a incapacidade de obter alimento e a restrição alimentar (Zengin e Yilmaz, 2016). Durante o período experimental, dos 31 DAE aos 70 DAE, a alimentação exógena foi alterada, tanto em qualidade como em quantidade, o que por sua vez, pode ter levado à alteração da taxa metabólica, resultando num possível aumento de ROS. Um aumento na produção das espécies reativas de oxigénio revela um aumento da atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, se o excesso de radicais formados ultrapassar a capacidade inerente à defesa antioxidante, dificilmente as enzimas antioxidantes eliminam o excesso dessas espécies reativas provocando assim, inativação das enzimas e por conseguinte stress oxidativo. É por esta razão, que as vitaminas antioxidantes devem ser suplementadas nas dietas. Assim, a reduzida atividade pode dever-se ao facto da dieta conter as vitaminas antioxidantes essenciais e indispensáveis à proteção dos tecidos que reduzam o excesso de radicais formados e ativem as enzimas a realizarem o seu papel, evitando assim o stress oxidativo e mantendo a homeostase celular. No entanto, apesar das vitaminas terem a capacidade de reduzir e neutralizar consideravelmente a ação dos radicais livres como o peróxido de hidrogénio (Ho *et al.*, 2013), um excesso de radicais livres produzidos também pode ser favorecido pelo impacto que a ingestão das vitaminas tem sobre as enzimas antioxidantes. Estudos anteriores em peixes mostraram que as vitaminas podem reduzir ou aumentar a expressão dos genes das enzimas antioxidantes, e por isso inativar ou ativar a sua função (Izquierdo *et al.*, 2013). Deyashi e Chakrabarty, 2016, afirmam que sob stress oxidativo severo, as células tentam neutralizar os efeitos oxidantes por ativação ou silenciamento de genes codificadores de várias enzimas antioxidantes.

Se as defesas antioxidantes endógenas e exógenas, não forem eficientes na proteção do organismo contra o stress oxidativo, isso pode levar à produção e ao acúmulo de mais ROS, que podem, por sua vez, ser responsáveis pela inativação das enzimas do sistema antioxidante ou, em situações mais dramáticas, levar a danos nos lípidos causados pela peroxidação lipídica. O dano oxidativo é então uma consequência do fracasso das defesas antioxidantes para remover ROS, levando a uma rutura no equilíbrio do sistema antioxidante.

A peroxidação lipídica tem sido amplamente utilizada como biomarcador do stress oxidativo (Monteiro *et al.*, 2010). Devido ao facto dos ROS serem instáveis e apresentarem uma vida média de milissegundos são difíceis de medir diretamente (Comhair e Erzurum,

2002; Damasceno *et al.*, 2002). Em vez disso, o que pode ser medido são os vários produtos de degradação de radicais livres resultantes da peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA) (Griffiths *et al.*, 2002), que é um dos principais contribuintes para a perda da função celular perante o stress oxidativo.

No presente estudo, de modo a avaliar se os três tipos de dietas com diferentes formulações vitamínicas conferiam proteção às pós-larvas de robalo contra o stress oxidativo, foram medidos os níveis de MDA. Os resultados relativos ao dano oxidativo, causado pela peroxidação lipídica, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando as pós-larvas foram alimentadas com as três dietas experimentais. No entanto, se analisarmos os resultados com base nos valores médios dos níveis de MDA é possível verificar que no tecido hepático das pós-larvas de robalo a suplementação vitamínica na dieta A e C parece aumentar os níveis de MDA e, por isso, o aumento do dano oxidativo nos lípidos. As pós-larvas de robalo quando alimentadas com a dieta B apresentaram aparentemente um menor dano oxidativo no tecido hepático. Ainda assim, os valores médios de MDA indicaram existir uma tendência para serem maiores nas pós-larvas alimentadas com a dieta A do que com a dieta C.

As atividades enzimáticas parecem estar diretamente relacionadas aos níveis de produtos de peroxidação lipídica, medidos pelos níveis de MDA. Assim, quando os valores médios de atividade das enzimas apresentaram ser maiores, os níveis médios de MDA diminuíram. Estes resultados observados neste trabalho foram semelhantes aos descritos por outros autores que observaram que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em larvas alimentadas resultou numa diminuição significativa na peroxidação lipídica (Zengin e Yilmaz, 2016). Perante isto, foi possível observar que o mecanismo envolvido na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos lipídicos foi coerente com o seu significado fisiológico em neutralizar a formação de ROS e diminuir assim os eventuais danos oxidativos.

Vários estudos sugerem que o stress provocado por uma deficiência nutricional na dieta é capaz de perturbar o equilíbrio entre os sistemas antioxidantes e a produção de ROS (Tocher, *et al.*, 2002; Ghazanfar *et al.*, 2017), causando danos oxidativos como a peroxidação lipídica. Existem, no entanto, suplementos que comprovadamente combatem essa condição, como é o caso das vitaminas. Tocher *et al.*, (2002), verificaram que uma dieta com níveis mais baixos de suplementação de vitamina E nas espécies *Scophthalmus maximus*, *Hippoglossus hippoglossus* e *Sparus aurata*, causou um aumento nos níveis de

peróxidos lipídicos. Outro estudo sobre o efeito das vitaminas na atividade das enzimas antioxidantes na espécie *Cyprinus carpio*, quando exposta a dois stressores ambientais, indicou que as concentrações de peróxidos lipídicos diminuíram significativamente quando os indivíduos foram suplementados com vitamina C na água (Ghazanfar *et al.*, 2017).

Tendo em conta que o nível de vitaminas contrabalança o dano oxidativo, quando a concentração da dieta é alterada tanto em quantidade como em qualidade, a taxa de eliminação das vitaminas pode ser influenciada pelos níveis de peroxidação lipídica. A vitamina C reage com o  $O_2$  antes do início do processo oxidativo e participa do sistema de regeneração da vitamina E, sendo importante para manter o potencial antioxidante dos tecidos. Dessa forma, as vitaminas C e E agem conjuntamente, reduzindo a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres induzida pelo  $H_2O_2$ . Como tal, a menos que seja ressintetizada, a vitamina E precisa de ser reabastecida diretamente através da dieta. No entanto, se uma dieta contiver níveis de vitamina E acima de um requisito mínimo não melhora as defesas antioxidantes e por isso, os requisitos em vitamina E dependem da suplementação de vitamina C na dieta, pois esta regenera a vitamina E (Kalaimani *et al.*, 2008). Por motivos de confidencialidade, não é possível saber quais as vitaminas a serem manipuladas. No entanto, perante os resultados não há diferenças significativas nas atividades das enzimas antioxidantes entre as dietas, nem na análise relativa aos danos oxidativos provocados pela peroxidação lipídica. Estes dados podem indicar assim, que as formulações usadas nas dietas são boas no que diz respeito aos tipos de vitaminas que foram manipuladas. É por isso, coerente afirmar, que as dietas experimentais não afetaram o sistema antioxidante nem causaram danos nos organismos em estudo. Pode por isso, ter havido uma notável propriedade de eliminação de radicais livres por parte das vitaminas presentes nestas dietas.

## 6. Conclusão

Durante o ensaio experimental em que as pós-larvas de robalo *Dicentrarchus labrax* foram alimentadas com três dietas experimentais com diferentes formulações vitamínicas, foi possível avaliar o desempenho do crescimento e da defesa antioxidante contra o stress oxidativo.

As dietas experimentais aqui testadas não afetaram o crescimento tendo por isso influência positiva na criação das pós-larvas.

Relativamente à análise do stress oxidativo, os resultados aqui obtidos mostraram que a resposta antioxidante das pós-larvas não parece ser afetada significativamente quando alimentadas com as diferentes dietas experimentais. O facto da produção de ROS medidos pela atividade destas enzimas ser semelhante entre os tratamentos pode querer dizer que as dietas não prejudicaram a resposta antioxidante das pós-larvas. No entanto, apesar de não serem significativos, mediante os valores médios de atividade da CAT, da SOD e da GPx os resultados revelaram menor e maior atividade dessas enzimas com a dieta A e C, respetivamente. Isto parece indicar que provavelmente houve uma influência do sistema endógeno contra a produção de ROS, e não do sistema de defesa antioxidante exógeno proveniente das vitaminas suplementadas nas dietas.

Pode-se dizer ainda que as formulações vitamínicas usadas nas dietas não provocaram danos nas membranas lipídicas das pós-larvas, como pode ser visto pelo padrão semelhante dos níveis de MDA entre as três dietas que não apresentaram qualquer efeito significativo. Ainda assim, os dados relativos aos valores médios parecem suportar que a dieta B foi a que apresentou melhores resultados em proteger os tecidos contra os danos oxidativos provocados pela peroxidação lipídica, sendo que as pós-larvas deste grupo possivelmente apresentaram menor dano oxidativo.

Por esta análise pode concluir-se que as formulações vitamínicas aqui testadas tem potencial para serem suplementos benéficos a incluir nas dietas inertes para aquacultura, pois intervém positivamente em dois aspetos principais de um processo de criação bem sucedido, não afetando o desempenho do crescimento, permitindo que as pós-larvas atinjam o tamanho comercializável mais cedo, mantendo ou melhorando a defesa antioxidante e reduzindo as eventuais perdas que possam surgir devido à exposição da ação dos ROS.



## 7. Perspetivas Futuras

Devido ao facto das larvas de peixes marinhos encontrarem-se permanentemente expostas à ação dos ROS, necessitam de um complexo e eficiente sistema de defesa antioxidante. Apesar do seu potencial nefasto, os ROS estão envolvidos em funções fisiológicas fundamentais às células e ao próprio organismo (incluindo mecanismos de defesa celular), tornando a vida inviável na sua ausência. Por isso, o equilíbrio entre a formação dos ROS e a atividade do sistema antioxidante é fundamental. Mais pesquisas nesse campo são relevantes e justificáveis, já que pouco se sabe sobre o metabolismo oxidativo em espécies de peixe como o robalo, por exemplo.

Além disso, as vitaminas constituem um potencial para serem um suplemento muito rentável para ser incluído nos alimentos para aquacultura. Para que no futuro estas possam ter um potencial terapêutico no combate ao stress oxidativo em larvas de robalo, é importante concentrar esforços na manipulação das dietas a fim de determinar com exatidão os níveis adequados e o tipo de vitaminas que melhor se adequam ao desempenho do crescimento, permitindo que as larvas de peixes marinhos atinjam o tamanho comercializável mais cedo e aumentem o potencial antioxidante reduzindo, desse modo, os danos causados pelo stress oxidativo. Como tal, seria por exemplo, importante avaliar a quantidade de tocoferóis que podem ser retidos nos tecidos e quais são as formas de tocoferóis e seus metabolitos que têm um impacto mais forte sobre o sistema antioxidante durante o desenvolvimento das larvas de peixes (Surai, 2002).

Em várias espécies de peixes, dados sobre o desenvolvimento de defesas antioxidantes sugeriram que os antioxidantes de baixo peso molecular exercem um papel fundamental na suplementação da dieta de larvas de peixes marinhos, uma vez que as enzimas antioxidantes não estão completamente desenvolvidas nesta fase tão precoce da sua vida (Surai, 2002; Fontagné et al., 2008). As enzimas antioxidantes vão se tornando mais evidentes com o desenvolvimento do organismo. Não se sabe se algum efeito benéfico dos antioxidantes da dieta poderia ter influenciado mais nos estádios iniciais de desenvolvimento. Tendo em conta que este estudo teve como objetivo focar no efeito de diferentes formulações vitamínicas nas enzimas antioxidantes, o esforço de amostragem foi direto para os estágios posteriores de desenvolvimento (31 DAE – 70 DAE) da espécie de robalo *Dicentrarchus labrax*, após terem sido alimentados com as três dietas experimentais. Neste estudo entre os 24 e os 30 DAE, as pós-larvas sofreram um período de adaptação ao alimento inerte, com um

decréscimo na quantidade de Artémia e introdução gradual e crescente de quantidade da microdieta inerte (Winfast, SPAROS). É possível que este período de adaptação ao alimento externo possa ter contribuído para mudanças metabólicas extremas e conseqüentemente para um aumento de ROS. Nesse sentido, seria interessante avaliar as enzimas entre esse período, para entender em qual estadio de desenvolvimento a ingestão de antioxidantes dietéticos pode ser mais benéfica.

Visto ser uma espécie de elevado interesse económico para a indústria de aquacultura, mais estudos são necessários para fornecer informações sobre a função e fisiologia do metabolismo oxidativo das pós-larvas de robalo quando alimentadas com dietas suplementadas com antioxidantes.

## 8. Referências Bibliográficas

- Ahmad, I., Maria, V.L., Pacheco, M., Santos, M.A., (2009). Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses following 17 $\beta$ -estradiol exposure. *Ecotoxicology* 18 (8), 974–982.
- Ahmad, S., (1995). Preface. In: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, NY, xi–xvii.
- Ameur, W.B., de Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M.R., Borràs, M. (2012). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*. 64: 241–251.
- Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal
- Arteel, G.E., Sies, H., (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10, 153-158.
- Atalah, E. (2008). Importance of the proportions of dietary polyunsaturated fatty acids and antioxidants in larval development of marine fish. PhD Thesis. University of Las Palmas de Gran Canaria, pp 242.
- Atalah, E., Hernández-Cruz, C.M., Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Ganga, R., Roo, J., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., (2010). Combined effect of vitamin C and vitamin E microdiets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*. XIVth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding.
- Atli, G., Canli, M., (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 145:282-287.
- Avilez, I.M., Hori, T.S.F., Almeida, L.C., Hackbarth, A., Bastos Neto, J.C., Bastos, V.L.F.C., Moraes, G., (2008). Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and physiology Part C* 148:136-142.
- Bell, J.G., Cowey, C.B., Adron, J.W., Pirie, B.J.S., (1987). Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture* 65, 43–54.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., (2004). *Bioquímica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Betancor, M.B, Atalah, E., Caballero, M.J., Benítez-Santana T, Roo, J., Montero, D., Izquierdo, M.S., (2009). Dietary  $\alpha$ -tocopherol in weaning diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) improves survival and tissue damage caused by excess dietary DHA contents, *Aquac Nutr* (submitted).
- Boyd, C.E., (2003). Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226(1-4), 101–112.
- Bradford, M.M., (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. PMID: 942051
- Burk, R.F., (2002). Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care*. 5, 75-9.
- Burton, G.W., Traber, M.G., (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 10, 357-382.
- Cahu, C., Infante, J.Z. and Takeuchi, T., (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
- Cañavate, J.P., Prieto, A., Zerolo, R., Solé, M., Sarasquete, C., Fernández-Díaz, C., (2007). Effects of light intensity and addition of carotene rich *Dunaliella salina* live cells on

- growth and antioxidante activity of *Solea senegalensis* Kaup (1858) larval and metamorphic stages. *Journal of Fish Biology*. 71, 781-794.
- Cerqueira, F.M., Medeiros, M.G., Augusto, O., (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 441-449.
- Chassaigne, H., Chéry, C.C., Bordin, C., Rodríguez, A.R., (2002). Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material. *Journal of Chromatography A* 976, 409-422.
- Chen, R.G., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K.J., (2004). Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, v.242, p.553-569.
- Comhair, S.A.A., Erzurum, S.C., (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v.283, p.L246-L255.
- Costantini, D., (2014). Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology: A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 348.
- Costantini, D., Angeletti, D., Strinati, C., Trisolino, P., Carlini, A., Nascetti, G., Carere, C., (2018). Dietary antioxidants, food deprivation and growth affect differently oxidative status of blood and brain in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 216, 1-7.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Walton, M.J., Murray, J., Youngson, A., Knox, D., (1981). Tissue distribution, uptake, and requirement for a-tocopherol of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 3, 1556–1567.
- Cowey, C.B., Bell, J.G., Knox, D., Farser, A., Youngson, A., (1985). Lipid and lipid antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 20, 567–572.
- Dabrowski, K., Bloom, J.H., (1994). Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108A, 129-135.
- Dabrowski, K., Kock, G., (1989). Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and their interaction with minerals in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 1952-1957.
- Dabrowski, K., Moreau, R., El-Saidy, D., Ebeling, J., (1996). Ontogenetic sensitivity of channel catfish to ascorbic acid deficiency. *Journal of Aquatic Animal Health* 8, 22-27.
- Dandapat, J., Chainy, G.B.N., Rao, K.J., (2003). Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131, 403– 410.
- Davies, K.J.A., (2000). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1–31.
- Deyashi, M., Chakraborty, S. B., (2016). Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant defense system in animal body. 2, 1–14.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 1103–1123.
- Díaz, M.E., Furné, M., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Domezain, A., Sanz, A., (2010). Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Aquaculture*, 307, 123–129.

- Droge, W., (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v.82, n.1, p.47-95.
- Erdelmeier, I., Gerard-Monnier, D., Yadan, J.C., Acudiere, J., (1998). Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*. 11, 1184-1194.
- European Commission, (2012). European seabass: *Dicentrarchus labrax*. Disponível em [https://ec.europa.eu/fisheries/marine\\_species/farmed\\_fish\\_and\\_shellfish/seabass\\_en](https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/seabass_en)
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, pp. 200.
- FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fernández-Díaz, C., Kopecka, J., Cañavate, J.P., Sarasquete, C., Solé, M., (2005). Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture*. 251, 573-584.
- Fernandez-Palacios H., Izquierdo, M.S., Gonzalez, M., Robaina, L., Valencia, A., (1998). Combined effect of dietary a-tocopherol and n3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock *Sparus aurata*. *Aquaculture*, v.161, p.475-476.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henrique, M.A., (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in river Douro estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*, 71(1), 39-48.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., (1991). Respiration and nitrogen metabolism of Atlantic halibut eggs (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Ecology* 108, 11–19.
- Flohé, L., Günzler, W.A., (1984). Assay of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105, 114-121.
- Fontagné, S., Lataillade, E., Brèque, J., Kaushik, S., (2008). Lipid peroxidative stress and antioxidante defence status during ontogeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*. 100, 102-111.
- Fridovich, I., (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review in Biochemistry* 64, 97-112.
- Fridovich, I., (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*; 893, 13-8.
- Frigg, M., Prabucki, A.L., Ruhdel, E.U., (1990). Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout fillets. *Aquaculture* 84, 145–158.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R.E.P., (2014). Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. *Aquaculture*, 422–423: 84–90.
- Gatlin, D.M., Poe, W.E., Wilson, R.P., (1986). Effects of singular and combined dietary deficiencies of selenium and vitamin E on fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition* 116, 1061-1067.
- Gatta, P.P., Pirini, M., Testi, S., Vignola, G., Monetti, P.G., (2000). The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 6, 47–52.
- Ghazanfar, M., Shahid, S., Qureshi, I.Z., (2017). Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. *Aquatic Toxicology*

- Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B.S., (2007). Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* 67 (6), 1171–1181.
- Gonçalves, A.C.S., Murgas, L.D.S., Rosa, P.V., Navarro, R.D., Costa, D.V., Teixeira, E.A., (2010). Desempenho produtivo de tambacus alimentados com dietas suplementadas com vitamina E. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.9, p.1005-1011.
- Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H., Astley, B., (2002). Biomarkers. *Mol. Aspects Med.* 23 (1–3), 101–208.
- Guerra, M.M.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C., (2004). Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: Revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.28, p.187-195.
- Hachero-Cruzado, I., Rodríguez-Rua, A., Román-Padilla, J., Ponce, M., Fernández- Díaz, C., Manchado, M., (2014). Characterization of the genomic responses in early Senegalese sole larvae fed diets with different dietary triacylglycerol and total lipids levels. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 12, 61-73.
- Haffray, P., Tsigenopoulos, C.S., Bonhomme, F., Chatain, B., Magoulas, A., Rye, M., Triantafyllidis, A., Triantaphyllidis, C., (2006). European sea bass – *Dicentrarchus labrax*. GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations.
- Halliwell, B., (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res*, 25(5):439-54.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press, v.1, 851p.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*; 186:1-85.
- Halliwell, B.H., Gutteridge, J.M.C., (2015). *Free Radicals in Biology and medicine*, 5th edn. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Hamre, K., Lie, O., (1995b). Alpha-tocopherol levels in different organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) effect on smoltification, dietary levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 111, 547-554.
- Hamre, K., Yúfera, M., Ronnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C, Izquierdo, M., (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture* 5 (Suppl. 1), S26–S58
- Heidinger, R.C., Crawford, S.O., (1977). Effect of temperature and feeding rate on the liver-somatic index of the Largemouth Bass, *Micropterus salmoides*. *Jour. Fish Res. Board* 34, 633-638.
- Henrique, M.M.F, Gomes, E.F., Gouillou-Coustans, M.F., Oliva-Teles, A., Davies, S.J., (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*. 161, 415–426.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M., Higuera, de la M., (2002). Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 183–193.
- Ho, E., Galougahi, K.K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A. (2013). Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.*, 1(1), 483-491.
- Hoar, W. S., Randall, D.J., (1988). *Fish Physiology, Volume XI, The Physiology of Developing Fish, Part A, Eggs and Larvae* (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds). London: Academic Press.

- Hochachka, P.W., Somero, G.N., (2002). Biochemical adaptation: mechanisms and process in physiological evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Hsieh, R.J., Kinsella, J.E., (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv Food Nutr Res* 33, 233–341.
- Ishibashi, Y., Kato, K., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T., Kumai, H., (1992). Effects of dietary ascorbic acid on tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. *Nippon Suisan Gakk.* 58, 2147–2152.
- Izquierdo, M.S. (1996). Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae – Review Article. *Aquaculture Nutrition*, 2: 183-191.
- Izquierdo, M.S., (1988). Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos. Modificación de la composición lipídica de las presas. PhD Thesis, University of La Laguna, 205 pp.
- Izquierdo, M.S., (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. In: Montero, D., Basurco, B., Nengas, I., Alexis, M., Izquierdo, M. (Eds.), *Mediterranean Fish Nutrition*, Zaragoza, Spain, p.158.
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. (1997). Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cahiers Options Méditerranéennes* 22, 243-264.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A.G.J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, v.197, p.25-42.
- Izquierdo, M.S., Scolamacchia, M., Betancor, M., Roo, J., Caballero, M.J., Terova, G., Witten, P.E., (2013). Effects of dietary DHA and  $\alpha$ -tocopherol on bone development, early mineralisation and oxidative stress in *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) larvae. *Br.J. Nutr.* 109, 1796–1805.
- Jennings, S., Pawson, M.G., (1992). The origin and recruitment of bass *Dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. *J Mar Biol Assoc UK* 72, 199–212
- Jiménez-Fernández, E., (2015). Incorporación de vitamina C en dietas larvárias y su implicación en el desarrollo de *Solea senegalensis*. Universidad de Cádiz. Tese de Doutoramento.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arnér, E.S.J., (2005). Selenocysteine in proteins – properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1726, 1-13.
- Junior, L.P.G., Souza, J.G.S., Mendonça, P.P., (2015). Necessidade dos peixes em vitaminas. *Revista eletrónica nutritime*. Artigo 293. Volume 12 – Número 01 – p.3925-3935
- Kalaimani, N., Chakravarthy, N., Shanmugham, R., Thirunavukkarasu, A.R., Alavandi, S.V., Santiago, T.C., (2008). Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval stages of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Physiol Biochem* 34, 151–158
- Kinnula, V.L., (2005). Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway disease. *Thorax*, v.60, p.693-700.
- Kiron, V., Thawonsuwan, J., Panigrahi, A., Scharsack, J.P., Satoh, S., (2011). Antioxidant and immune defences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquaculture Nutrition*, 17, 130-140.
- Klotz, L.O., (2002). Oxidant-induced signaling: effect of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biology and Chemistry* 383, 443-456.
- Knox, D., Cowey, C.B., Adron, J.W., (1984). Effects of dietary zinc intake upon copper metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 40, 199–207.
- Kole, A., (2003). Consumer opinions towards farmed fish, accounting for relevance and individual knowledge. In J. Luten, J. Oehlenschläger, G. Ólafsdóttir, *Quality of fish from*

- catch to consumer*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 393-400.
- Kolkovski, S., Lazo, J., Izquierdo, M., (2009). Fish larvae nutrition and diet: new developments. *New Technologies in aquaculture*. 11, 315-369.
- Kossmann, C.H., (1988). How do fish get their vital vitamin C? *Fish Farming International* 5, 30.
- Lamari, F., Mahdhi, A., Chakroun, I., Esteban, M.A., Mazurais, D., Amina, B., Gatesoupe, F.J., (2016). Interactions between candidate prebiotics and the immune and antioxidative responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of fish Diseases* 39, 1421-1432.
- Lee, K.J., Dabrowski, K., (2003). Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). *British Journal of Nutrition*, 89, 589–596.
- Leggatt, R.A., Iwama, G.K., (2009). Exogenous glutathione can increase glutathione levels in tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through extracellular breakdown and intracellular synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150: 322–328.
- Lesser, M.P., (2011). Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: Abele D, Zenteno-Savín T, Vazquez-Medina J, editors. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 7–19.
- Limón-Pacheco, P., Gonsebatt, M.E., (2009). The role of antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674, 137–147
- Lin, Y.H., Shiau, S.Y., (2005a). Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, v.250, p.356-363.
- Livingstone, D.R., (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 656-666.
- Lopes, T., (2014). Osteogénese, Vitamina A e anomalias esqueléticas em larvas de Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Pós-Graduação em Zootecnia.
- Luquet, P., Watanabe, T., (1986). Interaction Nutrition-Reproduction. *Fish Physiol Biochem*, v.2, p.121-129.
- Lushchak, V.I., (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Lygren, B., Hamre, K., Waagbo, R., (2000). Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* fed three different levels of dietary vitamin E. *Aquacult. Res.* 31, 401–407.
- Machlin, L.J., Bendich, A., (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*; 1, 441-5.
- Maret, W., (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox site. *J. Nutr.* 130, 1455S–1458S.
- Maria, V.L., Ahmad, I., Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A., (2009). Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1861-1870.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., (2005). Antioxidant defences in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 75-88.
- Matés, J.M., (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83–104.

- Maurente, L.P.B., (2016). Avaliação da suplementação vitamínica e mineral em rações para juvenis de *Macrobrachium rosenbergii* produzidos em sistemas de bioflocos. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.
- McCord, J.M., (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*; 108, 652-9.
- McCord, J.M., Fridovich, I., (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of biological chemistry*. 44(22), 6049-6055.
- Mehrotra, S., Kakkar, P., Viswanathan, P.N., (1991). Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. *Free Radic Biol Med*; 10, 277-85.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, P., Pector, R., Mai Soni, A.F., Abbes, M., Nelis, H., Ollevier, F., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., (1995). Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus Labrax* and *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Ichthyol*. 11, 336– 341.
- Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., De Nelis, H., Leenheer, A., Sorgeloos, P., (1996). Influence of dietary vitamin C dosage on turbot *Scophthalmus maximus* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* nursery stages. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114, 123-133.
- Miranda, E.C., Pinto, L.G.Q., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Pezzato, A.C., Furuya, W.M., (2000). Avaliação de vitaminas hidro e lipossolúveis em pós-larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 9.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 143, 141-149.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., (2010). Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19 (1), 105–123.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S., (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juvenils. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 473-490.
- Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastri, R., (1999). Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, Vol.1. FAO, Rome, Italy. 194 pp.
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Tocher, D.R., Bell, J.G., (2000). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids/vitamin E (PUFA/tocopherol) ratio on antioxidant defense mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Osteichthyes, Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 337–351.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz, E., Grau, A., Pastor, E., (1999). Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture*, 179, 309–324.
- Navarro, R.D., Filho, O.P.R., Ferreira, W.M., Pereira, F.K.S., (2009). A importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura. *Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n. 1, p.20-25.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Troell, M., (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017–1024.
- Ogino, C., Yang, G.Y., (1978). Requirement for rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1015–1018.

- Olsen, R.E., Henderson, R.J., (1997). Muscle fatty acid composition and oxidative stress indices of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in relation to dietary polyunsaturated fatty acid levels and temperature. *Aquacult. Nutr.* 3, 227–238.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, 145, 191-199.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*; 333, 19-39.
- Peters, L.D., Livingstone, D.R., (1996). Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *Journal of Fish Biology*, 49, 986-997.
- Peters, L.D., Porte, C., Livingstone, D.R., (2001). Variation of antioxidant enzyme activities of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae and organic contaminant levels in mixed zooplankton from the Southern North Sea. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 42, No. 11, pp. 1087-1095.
- Pickett, G.D., Pawson, M.G., (1994). *Sea Bass-Biology, Exploitation, and Conservation*. Chapman & Hall, London.
- Polatajko, A., Jakubowski, N., Spuznar, J., (2006). State of the art report of selenium speciation in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21, 639-654.
- Poston, H.A., Combs, G.F., Leibovitz, L., (1976). Vitamin E and selenium inter-relations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological, and biochemical deficiency signs. *J. Nutr.* 106, 892–904.
- Pousão-Ferreira, P.M., (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*. Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P. IPIMAR.
- Powell, S.R., (2000). The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130, 1447S–1454S.
- Prasad, A.S., (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol.* 43(5), 370-7.
- Rahman, K., (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
- Ramírez-Duarte, W.F., Jin, J., Kurobe, T., Teh, S.J., (2016). Effects of prolonged exposure to low pH on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Science of the Total Environment* 568, 26-32.
- Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Lindström-Seppä, P., (2002). Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*, 210, 1–19.
- Rotta, M.A., (2003). *Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes*. Corumbá: Embrapa Pantanal, p.54.
- Rover, J.L., (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v.24, n.1, p.112-119.
- Rowntree, J.E., (2004). Effect of Se on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. *Journal of Animal Science*, v.82, p.2995-3005.
- Rudneva I.I., (1999). Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 122, 265-271.
- Rudneva, I. (2014). *Biomarkers for Stress in Fish Embryos and Larvae*. Ukrain: Taylor & Francis Group. ISBN 13: 978-1-4822-0739-2.

- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J.W., De Coen, E., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T., Sorgeloos, P., (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231, 417–433.
- Sahyoun, N.R., (1997). Vitamin C: what do we know and how much do we need? *Nutr. Epidemiol.* 13, 835–836.
- Sen, C.K., (1995). Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 39, 177-196.
- Smith, S.M., Nager, R.G., Costantini, D., (2016). Meta-analysis indicates that oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecol. Evol.* 6, 2833–2842.
- Solé, M., Potrykus, J., Fernández-Díaz, C., Blasco, J., (2004). Variations on stress defences and metallothionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages. *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 57–66
- Stephan, G., Guillaume, J., Lamour, F., (1995). Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture* 130, 251–268.
- Stickney, R.R., (2000). *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc., Toronto, Canada. 1063 pp.
- Surai, P.F., (2002). *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham Univ, Press, Nottingham.
- Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M. and Ciftci, M., (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 148:117-121.
- Tidwell, J.H., Bright, L.A., (2018). *Freshwater Aquaculture*. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 107–184.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y., (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*. 8, 195-207.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J.O., Díaz, E., Wille, M., Bell, J.G. and Olsen, Y. (2002b). Comparative study of antioxidant defense mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidized oil and vitamin E. *Aquacult. Int.* 11, 195–216.
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J.F, Quasuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300: 142–147
- Valenti, W.C., Kimpara, J.M., Preto, B.L., Valenti, P.M., (2018). Indicators of sustainability to assess aquaculture systems. *Ecological Indicators* 88, 402-413.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J, Telser, J., (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37–56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 39, 44-84.

- Vand der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149
- Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Blasco, C., Connes, R., Flick, G., (2002). Location and morphology of chloride cells during the post-embryonic development of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Anat Embryol* 205, 203–213
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274-279.
- Wang, C., Lovell, R.T., (1997). Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152, 223-234.
- Wang, K., Wang, E., Qin, Z., Zhou, Z., Geng, Y., Chen, D., (2016). Effects of dietary vitamin E deficiency on systematic pathological changes and oxidative stress in fish. *Research paper: Pathology*, Vol. 7, (No. 51), pp: 83869-83879
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185–207.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Wada, M., Uehara, R., (1981). The relationship between dietary lipid levels and  $\alpha$ -tocopherol requirement of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, 1463-1471.
- Wheeler, A., (1975). *Fishes of the World*. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Wright, D.A., Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344.
- Zar, J.H., (2010). *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 944pp.
- Zengin, H., Akpınar, M.A., (2006). Fatty acid composition of *Oncorhynchus mykiss* during embryogenesis and other developmental stages. *Biologia*, 61 (3), 305–311. Bratislava.
- Zengin, H., Yilmaz, O., (2016). Antioxidant defence of the actively feeding *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) larvae in relation to dietary PUFA and vitamin E contents. *Regional Studies in Marine Science*.
- Zengin, H., Yilmaz, O., Demir, E., Gokçe, Z. (2015). Antioxidant Enzymatic Defences during Embryogenesis of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 15, 437-446.
- Zhang, H., Mu, Z.B., Xu, L.M., Xu, G.F., Liu, M., Shan, A.S., (2009). Dietary lipid level induced antioxidant response in Manchurian trout, *Brachymystax lenok* (Pallas) larvae. *Lipids* 44 (7), 643–654.
- Zhang, X.D., Zhu, Y.F., Cai, L.S., Wu, T.X., (2008). Effects of fasting on the meat quality and antioxidant defenses of market-size farmed large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 280 (1–4), 136–139.