



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Avaliação da atividade antioxidante da *Samanea tubulosa* na musculatura da tilápia do Nilo

Evaluation of the antioxidant activity of Samanea tubulosa on Nile tilapia musculature

Roselaine de Souza*, Ricardo Yuji Sado†, Keli Flores Garcêz‡,

Luis Castro Zambrano§, Paula Fernandes Montanher¶,

Vinicius Lemos Carvalho¹

RESUMO

O uso de aditivos como o extrato aquoso da *Samanea tubulosa* (EAST) na dieta torna-se interessante em piscicultura, devido sua elevada atividade antioxidante. Este estudo avaliou os efeitos da suplementação dietética do EAST na alimentação da tilápia do Nilo sobre a atividade antioxidante no tecido muscular. Os peixes (113,5 ± 9,0g) foram distribuídos em 12 tanques (250 L) e alimentados duas vezes ao dia (09:00h e 16:00h) até a saciedade por 60 dias, em um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (controle; 2% e 4% EAST na dieta) e três repetições. Após o período de alimentação, foi coletado tecido muscular para determinação atividade antioxidante. Os resultados foram submetidos a análise de variância. Os efeitos significativos foram comparados pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). A atividade antioxidante no tecido muscular aumentou ($p<0,05$) em peixes suplementados com 4% EAST com o método ABTS. Após a obtenção do extrato metanólico do tecido muscular, os peixes alimentados com 4% EAST, apresentam maior ($p<0,05$) atividade antioxidante com o método FRAP. Não foi observado efeito ($p>0,05$) na oxidação lipídica (TBARS). A inclusão de 4% EAST na dieta aumentou a atividade antioxidante no tecido muscular, apesar de não retardar os processos de oxidação lipídica.

Palavras-chave: Atividade Antioxidante, Nutrição de Peixes, Aditivos Naturais.

ABSTRACT

The use of additives such as the aqueous extract of *Samanea tubulosa* (EAST) in the diet becomes interesting in fish farming, due to its high antioxidant activity. This study evaluated the effects of dietary supplementation of EAST in Nile tilapia feed on antioxidant activity in muscle tissue. The fish (113.5 ± 9.0g) were distributed in 12 circular tanks (250 L) and fed twice a day (9:00 am and 4:00 pm) until satiety for 60 days, in a completely randomized design with three treatments (control; 2% and 4% EAST in the diet) and three repetitions. After the feeding period, muscle tissue was collected to determine antioxidant activity. The results were subjected to analysis of variance. Significant effects were compared by Tukey test ($\alpha=0.05$). Antioxidant activity in muscle tissue increased ($p<0.05$) in fish supplemented with 4% EAST with the ABTS method. After obtaining the methanolic extract from muscle tissue, fish fed with 4% EAST presented higher ($p<0.05$) antioxidant activity with the FRAP method. No effect ($p>0.05$) on lipid oxidation (TBARS) was observed. The inclusion of 4% EAST in the diet increased the antioxidant activity in fish muscle tissue, although it did not delay lipid oxidation processes.

Keywords: Antioxidant Activity, Fish Nutrition, Natural Additives.

* Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; roselaynesouzaa@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; ricardoysado@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; kelli_g_silva@hotmail.com

§ Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela; lcastrozam@hotmail.com

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; paulamontanher@utfpr.edu.br

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; vini-cius_lc@live.com



1 INTRODUÇÃO

Com a intensificação dos sistemas de produção, os peixes são expostos a condições de estresse, tais como manejos adotados nos sistemas de criação, mudanças climáticas, qualidade da água e nutrição (ELABD *et al.*, 2019), fatores que podem interferir na sua homeostase e impactar negativamente o sistema imunológico e a fisiologia do animal. Com isto, aumenta-se a suscetibilidade de doenças bacterianas, fúngicas e parasitárias, que reduzem o desempenho produtivo dos peixes. A crescente demanda por sistemas de produção mais sustentáveis, seja pela otimização no uso de recursos ou pelo uso de aditivos menos nocivos aos peixes como extratos e/ou óleos vegetais, tornou-se uma importante ferramenta dentro dos sistemas de produção de peixe (GABRIEL *et al.*, 2015). Esses compostos, também denominados aditivos naturais apresentam baixa toxicidade e maior potencial de biodegradação no ambiente aquático, promovendo, assim, a estabilidade na produção com menor risco ao ambiente aquático (UPADHAYA.; KIM, 2017). Além disso, tais extratos vegetais apresentam-se como potencializadores da atividade antioxidantes em animais de criação (BANDEIRA *et al.*, 2017), devido a presença de diversos componentes bioativos (SUN *et al.*, 2020).

A planta da espécie *Samanea tubulosa* (BENTH.) BARNEBY & GRIMES, conhecida popularmente também como “Bordão-de-velho” faz parte da composição arbórea da flora brasileira, pode ser encontrada na região norte, centro-oeste e nordeste, desenvolve-se em solos arenosos e bem drenados (OLIVEIRA; DA, 2012). A análise do extrato metanólico proveniente das folhas da *S. tubulosa*, apresentou inúmeras substâncias com atividade antioxidante, tais como os polifenóis e os flavonóides, os quais ajudam na defesa contra as doenças crônicas (ARAÚJO *et al.*, 2015). Visto que na piscicultura intensiva é comum observar o aumento do estresse oxidativo, surge a seguinte questão: como reduzir os efeitos da oxidação tecidual nos peixes de criação? Nesse contexto, os extratos e/ou óleos vegetais fornecidos na alimentação ou processamento do pescado apresentam potencial de inibição dos processos de oxidação dos ácidos graxos no tecido muscular e propiciar melhor qualidade e maior vida de prateleira. Porém, na literatura não há estudos da *S. tubulosa* e sua aplicação na alimentação da tilápia do Nilo e seus efeitos na atividade antioxidante do tecido muscular e desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de níveis crescentes do extrato aquoso da *S. tubulosa* na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo sobre a atividade antioxidante no tecido muscular.

2 MÉTODO

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino e Pesquisa em Piscicultura (UNEPE-PISCICULTURA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV).



Previamente, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) da UTFPR-DV para avaliação, e aprovado (Protocolo nº 2017- 022). Juvenis de tilápias do Nilo ($113,5 \pm 9,0$ g) foram sedados em solução alcoólica de benzocaína (1:10.000), pesados, medidos, e separados em lotes homogêneos distribuídos em 12 caixas de polietileno de 250-L, compondo um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: 0,0; 2,0 e 4,0 % de inclusão de extrato aquoso do fruto da *Samanea tubulosa* na dieta e quatro repetições ($n=4$). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09h00m e 17h00m) até aparente saciedade por 60 dias. As condições de temperatura ($26,8 \pm 1,8^\circ\text{C}$), pH ($7,5 \pm 0,7$) e oxigênio dissolvido ($5,5 \pm 0,9$ mg/L) na água foram monitoradas diariamente durante o período experimental. Os peixes passaram por um período de 07 dias de adaptação ao ambiente de laboratório e a dieta padrão. Foi balanceada uma dieta experimental de acordo com as exigências nutricionais para a fase de desenvolvimento e espécie do peixe. Após mistura dos ingredientes da dieta, foram adicionados o extrato aquoso da *S. tubulosa*.

A determinação da atividade antioxidante no tecido muscular das tilápias realizou-se ao final do período experimental de 60 dias. Os peixes foram submetidos a jejum de 24h e após isso, foram eutanasiados por superdosagem de anestésico seguido por secção medular para coleta de material biológico. O tecido muscular foi congelado (-20°C) para posterior liofilização. As amostras do tecido muscular liofilizado foram moídas e peneiradas (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012) e foi determinado a atividade antioxidante por meio dos seguintes ensaios: DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazil), ABTS (ácido 2,2'- anizo-bis((3- etilbenzotiazolina-6- sulfônico)) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), seguindo o procedimento de QUENCHER. Para tal, a $0,01 \pm 0,0001$ g de cada amostra foi adicionado 10 mL das respectivas soluções de trabalho para iniciar as reações. Todos os tubos foram agitados em vórtex (1 min), em Shaker de bancada (60 min) e centrifugados a 4000 rpm (5 min). As absorbâncias dos sobrenadantes foram mensuradas em espectrofômetro: 525 nm (DPPH), 734 nm (ABTS) e 593 nm (FRAP) (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012). Foi realizada uma curva de calibração para cada análise: DPPH ($Y = 0,0248X + 5,6605$; $R^2 = 0,999$); ABTS ($Y = 0,0409X + 3,926$; $R^2 = 0,9957$); FRAP ($Y = 0,0004X + 0,0025$; $R^2 = 0,9963$), sendo a capacidade antioxidante expressa em μmol de equivalente Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET/g}$). Também foi realizada a determinação da atividade antioxidante a partir do extrato metanólico do tecido muscular liofilizado segundo Serpen; Gökmen; Fogliano (2012). A mistura foi homogeneizada em 25°C a 250 rpm por 30 min e centrifugou-se a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e armazenado até sua utilização para determinação da capacidade antioxidante e Teor de Fenólicos Totais.

Foram utilizadas soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações conhecidas (6- Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) na faixa de 0-2000 $\mu\text{mol/L}$ para calibração. DPPH ($Y = -12,462X + 0,7348$; $R^2 = 0,9937$) ($\mu\text{mol ET/g}$); ABTS ($Y = -11,08X + 0,7258$; $R^2 = 0,9972$) ($\mu\text{mol ET/g}$); FRAP



($Y = 4,3687X + 3E-05$; $R^2 = 0,9996$) (Fe^{2+}/g); Fenólicos totais ($Y = 22,157X + 0,0188$; $R^2 = 0,9984$, e resultados expressos em mg de Equivalentes de Ácido Gálico/g de amostra seca (mgEAG/g)).

As análises de oxidação lipídica do tecido muscular foram realizadas pelo método TBARS. O tecido muscular foi picado e armazenados em refrigerador ($\pm 4^\circ C$) com controle de fotoperíodo (12h:12h). As análises da oxidação lipídica foram realizadas nos dias 0,1,3 e 7 de armazenamento. Para o ensaio seguiu as etapas de extração, reação ao ácido tiobarbitúrico e leitura em espectrofotômetro. A absorbância foi determinada em 532 nm e os resultados expressos em $mg \cdot kg^{-1}$ de MDA no tecido muscular. O valor do ácido tiobarbitúrico (TBA) foi expresso como micromoles de MDA por quilograma de carne de peixe e foi derivado da equação de regressão da curva padrão ($Y = 33,383X + 0,0688$; $R^2 = 1$) usando 1,1,3,3- tetrametoxipropano. Os resultados obtidos foram avaliados quanto às pressuposições estatísticas de normalidade (Cramer Von Mises) e homoscedasticidade (Brown-Forsythe). Os resultados foram submetidos a ANOVA e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3 RESULTADOS

Os resultados das análises dos ensaios DPPH, ABTS e FRAP pelo método de QUENCHER no tecido muscular, apresentam-se sumarizados na Tab. 1. Foi observado maior ($p < 0,05$) atividade antioxidante no tecido muscular pelo ensaio ABTS nos peixes suplementados com a dieta com 4% de EAST quando comparado ao controle e 2% de EAST. Entretanto, para o ensaio FRAP foi observado o oposto, em que peixes alimentados com a dieta controle e 2% de extrato apresentaram maior atividade antioxidante.

Tabela 1 - Atividade antioxidante (média \pm desvio padrão) do tecido muscular pelo procedimento de QUENCHER de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato aquoso de *S. tubulosa* (EAST) na dieta durante 60 dias.

Tratamentos	DPPH ($\mu mol ET/g$)	ABTS ($\mu mol ET/g$)	FRAP ($\mu mol Fe^{+2}/g$)
Controle	172,82 \pm 113,98	1062,27 \pm 216,19 ^b	116,50 \pm 22,08 ^a
EAST 2%	256,20 \pm 158,11	1086,17 \pm 122,96 ^b	102,03 \pm 27,41 ^a
EAST 4 %	162,62 \pm 94,52	1301,57 \pm 254,05 ^a	97,41 \pm 21,94 ^b
Valor de p	0,1425	0,0012	0,047

Fonte: Autoria própria (2021). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$). DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). FRAP: *Ferric Reducing Ability Power*.

Não foi observado efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre a atividade antioxidante do tecido muscular a partir de seu extrato metanólico (Tab. 2).



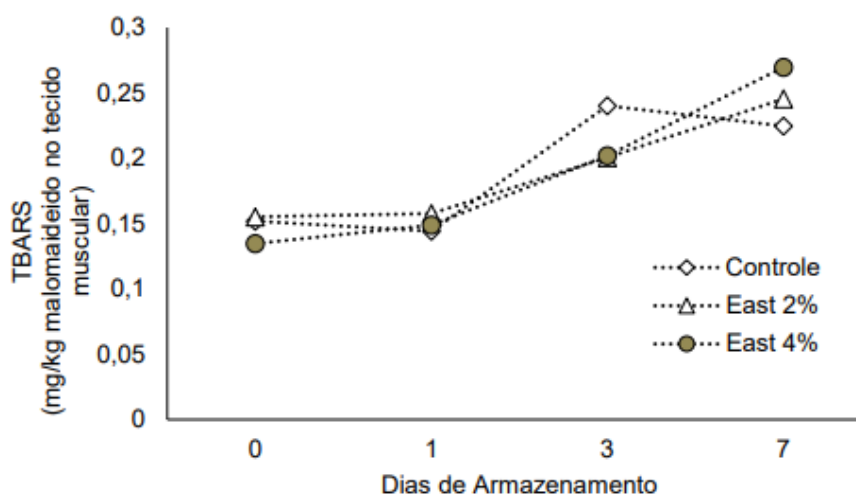
Tabela 2- Atividade antioxidante (média \pm desvio padrão) do extrato metanólico do tecido muscular de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato aquoso de *S. tubulosa* (EAST) na dieta durante 60 dias.

Tratamentos	DPPH ($\mu\text{mol ET/g}$)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$)
Controle	3,59 \pm 0,98	4,09 \pm 0,93	3,09 \pm 1,22
EAST 2%	3,93 \pm 0,79	4,32 \pm 1,14	3,14 \pm 1,28
EAST 4 %	3,90 \pm 0,76	4,01 \pm 0,88	3,41 \pm 1,57
Valor de p	0,2689	0,5122	0,624

Fonte: Autoria própria (2021). DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). FRAP: *Ferric Reducing Ability Power*.

A suplementação do extrato aquoso da *S. tubulosa* também não afetou de forma significativa o processo de peroxidação lipídica (TBARS) no decorrer de sete dias de avaliação do tecido muscular (Fig. 1).

Figura 1 - Determinação da oxidação lipídica (mg.kg^{-1} de malonaldeído no tecido muscular) pelo ensaio de TBARS durante sete dias de armazenamento do tecido muscular de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de extrato aquoso de *S. tubulosa* (EAST) na dieta durante 60 dias.



Fonte: Autoria própria. (2021).

4 CONCLUSÃO

A utilização do EAST como suplemento na alimentação de tilápias do Nilo a 4% apresentou atividade antioxidante no tecido muscular em diferentes ensaios e metodologias aplicadas, contribuindo, assim, com a ampliação de estudos dos produtos naturais no setor da produção animal.



AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e a Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. R. L. DE et al. Toxicidade reprodutiva de samanea tubulosa em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 4, p. 342–349, 2015.
- BANDEIRA, G. et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, n. May 2019, p. 484–491, 2017.
- ELABD, H. et al. Dietary supplementation of Moringa leaf meal for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Effect on growth and stress indices. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 3, p. 265–271, 2019.
- GABRIEL, N. N. et al. Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 504–514, 2015.
- OLIVEIRA, T. K. DE; LUZ, S. A. DA. Influência do Bordão-de-velho (*Samanea tubulosa* (Bentham) Barneby; Grimes) na Pastagem e no Solo em Sistema Silvipastoril no Acre. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, p. 28, 2012.
- SERPEN, A.; GÖKMEN, V.; FOGLIANO, V. Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 60–65, 2012.
- SUN, Z. et al. Effects of dietary *Senecio scandens* buch-ham extracts on growth performance, plasma biochemical, histology and the expression of immune-related genes in hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 98, p. 681–690, 2020.
- UPADHAYA, S. D.; KIM, I. H. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals - A review. **Annals of Animal Science**, v. 17, n. 4, p. 929–948, 2017.