

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
BACHARELADO EM ZOOTECNIA

NAYARA SANTINA VIEIRA

**SEMENTE DE FENO GREGO (*Trigonella foenum graecum*) NA
ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA
CAPACIDADE IMUNOESTIMULANTE E PROMOTORA DE
CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO FILÉ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2019

NAYARA SANTINA VIEIRA

SEMENTE DE FENO GREGO (*Trigonella foenum graecum*) NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE IMUNOESTIMULANTE E PROMOTORA DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO FILÉ

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao Curso de Bacharelado em Zootecnia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de ZOOTECNISTA.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado
Co-orientadora: Prof. Dr. Paula Fernandes Montanher

DOIS VIZINHOS
2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Coordenação de Zootecnia
Curso de Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO TCC

SEMENTE DE FENO GREGO (*Trigonella foenum graecum*) NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA CAPACIDADE IMUNOESTIMULANTE E PROMOTORA DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO FILÉ

Autor: Nayara Santana Vieira
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado
Co-orientadora: Prof. Dr. Paula Fernandes Montanher

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADO em 19 de junho de 2019.

Dr.: Sabrina Endo Takahashi

Dr.: Paula Fernandes Montanher

Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado
(Orientador)

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

À Deus, por não permitir que eu desistisse de mim quando já não enxergava motivos para continuar.

Aos meus pais, irmãs e amigos que sempre estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão à Deus, por estar sempre ao meu lado no decorrer de mais essa caminhada, provendo toda ajuda necessária tanto a nível pessoal, quanto colocando em meu caminho os amigos, professores, colegas e instrumentos, sem os quais nada seria possível.

Ao meu orientador Ricardo, por me instruir durante os vários anos de orientação e me mostrar que um parafuso mostra seu potencial quando é apertado. Gratidão por sempre me cobrar, afim de que eu me torno o melhor que posso ser. Foi nos momentos de desespero e confusão que tive a certeza de ter escolhido um bom orientador.

Sou grata à minha co-orientadora, Professora Paula, pela colaboração e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Sua paciência e amizade foram muito importantes pra mim.

Minha família que sempre torceu por mim e entenderam que eu não poderia passar as festividades de fim de ano com eles por que este projeto era muito importante pra mim.

Aos colegas da UNEPE piscicultura pela ajuda durante e após o período experimental.

Ao meu namorado Newton por ser meu parceiro fiel na realização das atividades diárias durante os fins de semana e nos feriados. Obrigada por seu esforço, seu carinho e seu trabalho, mas mais do que isso, obrigada por me encorajar e me dar forças para vencer mais esta fase.

Aos meus amigos, Thais, Leandro, Lucas, Josieli e Marcos que mesmo longe sempre me deram força e colaboraram para que eu não desistisse. Deus os recompense muito.

A todos que não citei, mas que contribuíram para a realização de mais esta etapa, muito obrigada.

A UTFPR-DV e todos seus servidores, obrigada por cada um que fazendo sua parte, colaboraram para a realização desse estudo.

*O que prevemos raramente ocorre;
O que menos esperamos geralmente acontece.
Benjamim Disraeli*

RESUMO

VIEIRA, Nayara Santana. **Semente de feno grego (*Trigonella foenum graecum*) na alimentação de tilápia do Nilo: avaliação *in vivo* da capacidade imunestimulante e promotora de crescimento e atividade antioxidante no filé.** 47 f. TCC (Curso Bacharelado em Zootecnia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

A intensificação dos sistemas de produção expõe aos animais uma série de eventos estressantes, com isso torna-se necessário o uso de produtos que aumentam a resistência do organismo. Para diminuir o uso de produtos sintéticos fornecidos aos animais, muitos estudos com fitoterápicos tem sido realizados, dentre eles o feno grego (*Trigonella foenum graecum*). O feno grego é rico em polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides e carotenoides, apresentando resultados positivos como imunestimulante, promotor de crescimento e com efeito antioxidante. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da inclusão de níveis crescentes de feno grego na dieta de tilápia do Nilo sobre parâmetros imunológicos, de desempenho e atividade antioxidante no filé. Este é um trabalho pioneiro no Brasil. Foram três tratamentos (0 %, 1 % e 2 % de inclusão) e quatro repetições, em que juvenis de tilápias foram pesados e medidos e posteriormente distribuídos aleatoriamente em caixas de polietileno num sistema de recirculação. Foram alimentados por 45 dias com as dietas experimentais. Após o período experimental foi realizada a biometria de todos os animais, bem como as análises hematológicas, imunológicas, de atividade antioxidante e de desempenho. Os parâmetros de qualidade da água estiveram dentro dos ideais para a espécie. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando identificadas diferenças significativas foram comparados pelo teste de média ($\alpha=0,05$). Não houve efeito dos tratamentos sobre os parâmetros hematológicos, imunológicos e da atividade antioxidante no filé. No entanto, o desempenho foi influenciado ($p<0,05$) pelos tratamentos. Os peixes alimentados com inclusão de 1 % de feno grego apresentaram maior GP e CR, quando comparados com o grupo controle. Os animais suplementados com feno grego apresentaram melhores ICA quando comparados ao controle. Os resultados indicam que a inclusão de feno grego na dieta de tilápias do Nilo não causam danos à saúde do peixe, podendo ser fornecido como aditivo alimentar para melhores resultados de desempenho zootécnico. Mais estudos são necessários para determinação da dose ideal de inclusão, bem como o tempo de administração.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*. Sistema imune. Oxidação lipídica. Desempenho.

ABSTRACT

VIEIRA, Nayara Santana. **Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) in Nile tilapia feeding: *in vivo* evaluation of immunostimulating and growth promoting capacity and antioxidant activity in fillet.** 50 f. TCC (Curso Bacharelado em Zootecnia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

The intensification of production systems exposes animals to a series of stressful events, which makes it necessary to use products that increase the resistance of the organism. To reduce the use of synthetic products supplied to the animals, many studies with herbal medicines have been carried out, among them the fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). The fenugreek is rich in polyphenols, flavonoids, phenolic acids, alkaloids and carotenoids, presenting positive results as immunostimulant, growth promoter and antioxidant effect. The objective of this work was to analyze the effect of the inclusion of increasing levels of fenugreek on the diet of Nile tilapia on immune parameters, performance and antioxidant activity in fillet. This is a pioneering work in Brazil. There were three treatments (0%, 1% and 2% inclusion of fenugreek) and four replications, in which tilapia juveniles were weighed and measured and later distributed randomly in polyethylene boxes in a recirculation system. They were fed for 45 days with the experimental diets. After the experimental period the biometry of all the animals was carried out, as well as the hematological, immunological, antioxidant activity and performance analyzes. The parameters of water quality were within the ideal for the species. The data were submitted to analysis of variance and when significant differences were identified were compared by the mean test ($\alpha = 0.05$). There was no effect of the treatments on hematological, immunological parameters and antioxidant activity in fillet. However, performance was influenced ($p < 0.05$) by treatments. Fish fed with 1% of fenugreek presented higher GP and CR, when compared to the control group. Animals supplemented with fenugreek presented better ICA when compared to control. The results indicate that the inclusion of fenugreek in the diet of Nile tilapia does not cause damage to the health of the fish and can be supplied as food additive for better results of zootechnical performance. More studies are needed to determine the optimal dose of inclusion as well as the time of administration.

Keywords: Tilapia of the Nile. Fenugreek. Antioxidant. Immunostimulant. Growth promoter.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Geral:	12
2.2 Específicos:	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Aquicultura no brasil e no mundo	13
3.2 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	13
3.2.1 Sistema Imune	14
3.2.2 Oxidação lipídica	16
3.3 Feno grego (<i>Trigonella foenum graecum</i>)	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Local do experimento	21
4.2 Preparo das dietas	21
4.3 Arranjo experimental	22
4.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos	23
4.4.1 Estimativa da concentração de hemoglobina	23
4.4.2 Valor do hematócrito	23
4.4.3 Contagem total de eritrócitos	23
4.4.4 Variáveis hematimétricas: VCM, HCM, CHCM	24
4.5 Avaliação de parâmetros imunológicos	24
4.5.1 Atividade respiratória dos leucócitos – <i>burst</i> oxidativo	24
4.5.2 Concentração de lisozima plasmática	25
4.5.3 Concentração de lisozima no muco	26
4.5.4 Proteína total plasmática	26
4.6 Atividade antioxidante no filé	26
4.6.1 Preparo dos extratos dos filés	27
4.6.2 Ensaio DPPH (eliminação de radicais livres)	27
4.6.3 Teor de fenólicos totais (TPC)	27
4.7 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico	29
4.8 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Parâmetros hematológicos e imunológicos	30
5.2 Atividade antioxidante no filé	30
5.3 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico	31
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Em 2018 o Brasil produziu mais de 722 mil toneladas de peixe, sendo que 55,4 % deste montante foi de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo superior à 2017, em que esta espécie representava pouco mais de 51 % da produção total (KUBITZA, 2015; PEIXEBR, 2019). Esses números são resultados do esforço mútuo entre produtores, pesquisadores e gestores públicos, que trabalham em prol de animais com padrão genético internacional, nutrição de qualidade e equilibrada e maior rigidez no controle e fiscalização das enfermidades (PEIXEBR, 2018).

Entre os fatores que podem acarretar disfunções nos peixes, estão a má qualidade da água; a nutrição desequilibrada e alta densidade quando acima dos limites suportados pelas espécies, podem provocar estresse crônico; levando ao aparecimento de surtos epizooticos, ocasionando perda parcial ou total da produção (AWAD et al, 2015; OBA; MARIANO; SANTOS et al., 2009). Para atenuar os efeitos causados nos animais, são ministrados muitos tipos de quimioterápicos, que embora não sejam proibidos, sua utilização tem sido reduzida por apelo da população que tem optado por alimentos produzidos de forma mais ecológica e com menor contaminação residual (GUARDIOLA et al., 2017a).

Entre os quimioterápicos mais utilizadas na aquicultura, estão a oxitetraciclina que é usada em subdosagens como promotora de crescimento; o sulfato de cobre no controle de ectoparasitas; o verde de malaquita que é administrado para o controle de doenças fúngicas e o levamisol como imunoestimulante; todavia, o uso destes produtos sintéticos também podem acarretar resistência nas bactérias e deixar resíduos no produto final. (DONE; HALDEN, 2015, CABELLO et al., 2013; REDA et al., 2013; ANUTA et al., 2011).

Para conseguir resultados semelhantes aos que são alcançados pelos quimioterápicos, porém sem que haja o risco associado ao uso dos desses produtos, muitos estudos têm avaliado o efeito na saúde e no desempenho animal após a administração de fitoterápicos como o limonete, o palmito, hortelã, o alho e o feno grego (ADEL et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2017; ESTEBAN et al., 2014; GHEHDARIJANI et al., 2016; GUARDIOLA et al., 2017b; ; JIAN; WU, 2003 OLAIYA; SOETAN, 2014; ; SANTOS; LUDKE; LIMA, 2009; THOMAS et al., 2011; VALLADÃO, 2014).

O feno grego (*Trigonella foenum graecum*) é uma especiaria utilizada há centenas de anos na medicina tradicional humana como imunoestimulante e tratamento de lesões, abscessos, úlceras, problemas digestivos e redutor do colesterol (HEUZÉ et al., 2018; WANI; KUMAR, 2018). Muitos estudos têm sido realizados buscando elucidar os feitos dessa planta

na saúde e desenvolvimento de peixes, ratos e humanos. Dentre os resultados encontrados, estão o efeito imunestimulante, efeito anti-inflamatório, atividade hipoglicêmica, efeito antioxidante e atividade promotora de crescimento (AWAD; AWAAD, 2017; BAHI et al., 2017; BIN-HAFEEZ et al., 2003; GUARDIOLA et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; GÜLTEPE et al., 2014; LIU; KAKANI; NAIR, 2012; KHALAF et al., 2008; SHALABY, 2004; SYEED et al., 2018; ZAKI et al., 2012).

A literatura brasileira com estudos sobre a administração de sementes de feno grego na dieta de tilápias e seus efeitos sobre a imunidade, desempenho e atividade antioxidante no filé é escassa, diante disso, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o potencial imunestimulador, promotor de crescimento e antioxidante das sementes de feno grego fornecidas na dieta de tilápias do Nilo. Este é um estudo pioneiro no Brasil, pois até o momento não há publicações relativas a influência da administração de sementes de feno grego sobre as variáveis estudadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar o potencial da semente de feno grego como imunoestimulante sobre o desempenho e variáveis hematológicas de tilápias do Nilo e atividade antioxidante no filé.

2.2 Específicos:

- Avaliar a influência da inclusão de feno grego sobre os parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia do Nilo;
- Avaliar a inclusão de diferentes concentrações de semente de feno grego na dieta de tilápia do Nilo sobre o desempenho zootécnico
- Determinar o potencial antioxidante da semente de feno grego no filé de tilápia do Nilo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aquicultura no brasil e no mundo

A humanidade enfrenta um grande desafio: aumentar a quantidade de alimento produzido sem degradar as áreas existentes, sendo crucial a adoção de técnicas que causem menores impactos ambientais (FAO, 2018). A Agenda 2030 da ONU e seus 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável é um plano de ação com metas para garantir melhor qualidade de vidas às pessoas, assegurando-as uma vida próspera e pacífica, assim como proteger o planeta da degradação. Para que esses objetivos sejam alcançados, a agricultura é um ponto fundamental, e neste quesito, a aquicultura está diretamente ligada em particular aos ODS 2, 14 e 15 que tem como metas acabar com a fome, promover a agricultura sustentável, conservar os oceanos e recursos marinhos, e proteger todos os ecossistemas terrestres (MUNDO, 2015).

Dentro da produção de pescados, a atividade é dividida entre pesca e aquicultura, sendo que esta última é o cultivo de organismos aquáticos em ambientes confinados e controlados, onde os mais comuns são os viveiros escavados e tanques-rede (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2018). Estes sistemas são predominantemente semi-intensivos no Brasil (PEIXEBR, 2018), e são um incremento para a piscicultura mundial, com os sistemas intensivos e superintensivos, no entanto quando se faz uso de altas taxas de lotação os riscos relacionados à doenças são maiores (LIMA et al., 2006). Dentre as espécies mais produzidas nos sistemas semi-intensivos está a tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

3.2 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

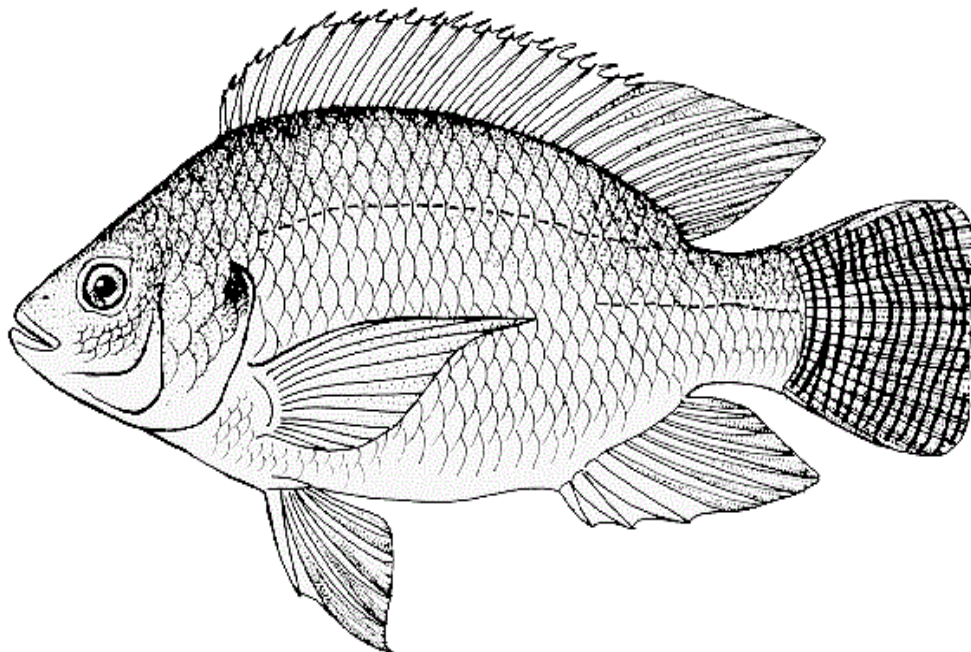
A tilápia do Nilo *O. niloticus* (Linnaeus, 1758), (figura 1) pertence à família Cichlidae. Espécie de peixe nativo da África, e introduzidos em muitas regiões tropicais, subtropicais e regiões temperadas do mundo durante a segunda metade do século XX (EL-SAYED, 2006; BOASCARDIN, 2008).

Apresenta hábito alimentar onívoro que se alimenta de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, fauna bêntica e detritos (FAO, 2019). É um dos peixes mais produzidos no mundo, pois possui bom desempenho zootécnico considerando-se: crescimento rápido, capacidade de se reproduzir em cativeiro e curto tempo de geração, aceitação de alimentos artificiais imediatamente após a absorção do saco vitelínico, alto

rendimento de filé, rusticidade (tolera mudanças bruscas de temperatura, salinidade, baixo oxigênio dissolvido, etc.), alta resistência ao estresse e doenças, principalmente tratando-se da produção em sistemas semi intensivo e intensivo (EL-SAYED, 2006; KUBITZA, 2015; SCORVO FILHO et al., 2010).

Embora a tilápia apresente essa característica de alta resistência e rusticidade, também sofre com as alterações dos parâmetros físico químicos da água e com o estresse inerente à produção que afetam diretamente seu sistema imunológico, levando a resultados não satisfatórios de produção (EL-SAYED, 2006).

Figura 1 – Ilustração representativa da tilápia do Nilo (*O. niloticus*)



Fonte: FAO (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)

3.2.1 Sistema Imune

O sistema imune dos peixes pode ser classificado em dois mecanismos de defesa: o sistema imune inato (inespecífico) e o sistema imune adquirido (específico). O sistema imunológico inato é de importância primordial no combate a infecções em peixes e possui uma rápida resposta, enquanto a resposta imune adquirida dos peixes é lenta (até 12 semanas). O sistema imunológico inato também é importante na ativação de uma resposta imune adquirida (ALEXANDER; INGRAM, 1992; MAGNADÓTTIR, 2006; ROMANO, 2012).

O sistema imunológico inato é composto por: barreiras físicas (muco, escamas e pele), sendo que o muco é a primeira barreira de defesa e rico em lisozima, um bactericida natural; barreiras celulares (granulócitos, monócitos, macrófagos, e células *natural killer*) que são

responsáveis pela eliminação dos patógenos; e barreiras humorais (sistema complemento, sistema de coagulação, lactoferrina e transferrina, interferóns, lisozima, interleucina) (MAGNADÓTTIR, 2006; SHEPHARD, 1994; ROMANO, 2012; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014).

Os leucócitos são as células com muitas funções no organismos, as quais se destacam: fagocitose durante a defesa contra parasitos (monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos); defesa orgânica (leucócitos e trombócitos); migração para o foco inflamatório (monócitos); e reconhecimento de antígenos e montagem da resposta imune (linfócitos) (URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

A lisozima é uma enzima importante no combate a infecções, pois apresenta atividade lítica contra bactérias gram-positiva e gram-negativa, e está presente no muco, tecidos linfoides, plasma e outros fluidos do corpo (MAGNADÓTTIR, 2006; PALAKSHA et al., 2008; URIBE et al., 2011). A atividade desta enzima pode variar de acordo com fatores edafoclimáticos, condição animal (sexo e idade), grau de estresse e uso de substâncias que agem sobre o metabolismo animal (imunoestimulantes) (SAURABH; SAHOO, 2008).

As células imunológicas possuem receptores de reconhecimento padrão que interatuam com um padrão de cada microrganismo, denominado de padrão molecular associado aos patógenos, por isso, essa interação específica torna possível o reconhecimento do patógeno e constitui o fator mais importante da resposta imune, pois estimula as células imunológicas (KREUTZ; PIETRETTI; DI DOMENICO, 2017; PALTÍ, 2011).

As substâncias que estimulam as funções imunológicas mediante aumento da atividade fagocíticas e bactericida, são denominadas imunoestimulantes (ZEPPENFELD; LOPES; BALDISSEROTTO, 2017) e são amplamente utilizadas para obter melhores resultados de desempenho.

Os imunoestimulantes podem ser de origem vegetal, animal, microbiana ou sintética, porém todos são equiparados quanto ao fato de interagirem com os receptores de reconhecimento padrão presentes nas células do sistema imunológico, estimulando o sistema imune inato e adquirido (KREUTZ; PIETRETTI; DI DOMENICO, 2017). Quando fornecido em quantidades seguras, apresentam também melhora no crescimento e resistência contra parasitos, assim, pode ser usado como agentes profiláticos e terapêuticos alternativos na aquicultura (GHEHDARIJANI et al., 2016; REDA et al., 2013; SUBHASHINI; THANGATHIRUPATHI; LAVANYA, 2011).

A otimização dos mecanismos de defesa naturais dos peixes pode conferir aos animais melhores resultados zootécnicos, devido à capacidade de minimizar os efeitos causados por

ataques de patógenos oportunistas, diminuindo também os processos de oxidação lipídica (ZEPPENFELD; LOPES; BALDISSEROTTO, 2017) e melhor qualidade organoléptica do filé.

3.2.2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica da carne é responsável pela piora da sua qualidade e de seus subprodutos, pois provoca alterações nas propriedades organolépticas bem como altera o valor nutricional, podendo ainda produzir compostos tóxicos, sendo a oxidação afetada por fatores *ante* e *post mortem*, fazendo-se necessário atenção a toda a cadeia produtiva (JENSEN; LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998).

O pescado por possuir em sua composição alto teor de água, elevado percentual de gorduras insaturadas, e baixa quantidade de tecido conjuntivo, que combinado com o pH próximo do neutro, torna a oxidação lipídica mais acelerada (ANDRADE, 2006). A oxidação lipídica é responsável pela produção de radicais livres, sendo estes formados pelo ganho ou perda de um elétron de um não radical, ocorrendo principalmente nas mitocôndrias (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HEKIMI; LAPOINTE; WEN, 2011). Os radicais livres cujo elétron desemparelhado está centrado nos átomos de oxigênio podem ser denominados de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio), presentes em todos os sistemas biológicos, e em homeostasia, são essenciais para o funcionamento do organismo (LUSHCHAK, 2011), porém quando em altas concentrações podem trazer danos ao organismo, por meio da oxidação de lipídios, proteínas e DNA dificultando as funções fisiológicas (SACCOL; LLESUY; PAVANATO, 2017; LUSHCHAK, 2014).

A fim de amenizar as implicações da toxicidade que o excesso de O₂ causa, os organismos aeróbios desenvolveram um sistema de defesa antioxidante apto a manter as EROs em níveis que não causem danos ao organismo (SACCOL; LLESUY; PAVANATO, 2017), no entanto quando esse sistema não é capaz de manter esse equilíbrio, pode surgir o estresse oxidativo, que é um dano macromolecular não fisiológico causando a interrupção da sinalização *detox* (WELKER et al., 2013). O estresse oxidativo pode ocorrer em três situações: quando há aumento na geração de ERO, quando o sistema de defesa antioxidante não consegue manter as EROs em níveis não danosos ou quando o dano oxidativo é muito alto e o organismo não é capaz de repará-lo (SACCOL; LLESUY; PAVANATO, 2017).

Nos organismos aquáticos o estresse oxidativo pode ser induzido pelo estresse durante o manejo (manuseio, biometria, transporte, densidade) e surtos epizoóticos, acarretando em

resultados de desempenho insatisfatórios (LUSHCHAK, 2011; ZHU et al., 2008). O estresse oxidativo pode ser diminuído por meio do uso de imunostimulantes e também pela inclusão de antioxidantes nas dietas.

Antioxidante é o nome dado às substâncias que tem o potencial de impedir ou retardar o aparecimento de alterações oxidativas no alimento ou no organismo (ANVISA, 2014; LUSHCHAK, 2014). Já do ponto de vista químico, são os compostos aromáticos, contendo pelo menos uma hidroxila a qual pode ser sintético: como o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), ou naturais: como os produzidos pelo corpo, sendo os mais conhecidos o superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GSH) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os antioxidantes naturais podem ainda ser de origem exógena acrescentados à dieta como os organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos como nas plantas nutraceuticas (RAMALHO; JORGE, 2006; REYES-BECERRIL et al., 2019).

Os antioxidantes podem atuar no organismo de quatro formas: inibindo a formação dos radicais livres; impedindo que os radicais quando já formados atuem sobre os lipídios, proteínas e DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular; reparando as lesões causadas pelos radicais; ou ainda com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes, pode ocorrer uma adaptação do organismo em relação ao excesso de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Antioxidantes sintéticos (TBHQ, BH e BHA) são amplamente utilizados por serem mais eficazes e mais baratos que os naturais, no entanto, a segurança e a toxicidade levantaram preocupações importantes (SAEED et al., 2013). Neste sentido, muitas plantas e seus extrativos tem sido utilizada para substituição dos antioxidantes sintéticos. As plantas que são estudadas por apresentarem potencial antioxidante são ricas em compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis, (ECOTROPE, 2017; REYES-BECERRIL et al., 2019).

Os compostos fenólicos são substâncias biotivas como os flavonoides (antocianinas, flavonóis, flavonas, etc.) e os não flavonoides (ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas etc.). Suas propriedades *redox* agem de diferentes formas: eliminando os radicais livres e as EROs, inibindo enzimas oxidativas ou ainda pode agir através da interação com biomembranas (SACCOL; PAVANATO, 2017; SOARES, 2002). Os carotenoides têm o potencial de neutralizar as EROs, através da alteração da permeabilidade de bicamadas lipídicas (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). Os tocoferóis têm a capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, interrompendo sua propagação

(RAMALHO; JORGE, 2006). Uma planta rica nestes compostos e promissor na alimentação de peixes é o feno grego (*T. foenum graecum*)

3.3 Feno grego (*Trigonella foenum graecum*)

O feno grego *T. foenum graecum* (Linnaeus, 1758) é uma cultura anual, membro da família das leguminosas, gênero *Trigonella*, que tem seu nome derivado do grego antigo, denotando 'três ângulos', provavelmente referente a forma triangular das flores (Figura 2).

Figura 2: Ilustração representativa do feno grego *Trigonella foenum-graecum*



Fonte: MEYER, 2019 (<http://dico-sciences-animales.cirad.fr/>)

É uma planta originária da Índia e do norte da África, mas atualmente é cultivado também no Egito, Marrocos, Argentina, França, China, Chile e nos Estados Unidos. Nas regiões semiáridas da América do Norte é considerada uma cultura de nicho de alto

rendimento (ACHARYA; THOMAS; BASU, 2008; HEUZÉ et al., 2018; SNEHLATA; PAYAL, 2012).

É uma planta que pode chegar a 0,8 m de altura, que no início do verão apresenta flores brancas que se desenvolvem numa espécie de casca que abriga as sementes. As folhas verdes e sementes são amplamente usadas nos países orientais na culinária como tempero por seus benefícios nutricionais e medicinais. Há registros de seu consumo datados de 1.500 a.C. (MANDHARE et al., 2016; WANI; KUMAR, 2018).

Muitos estudos têm sido realizados buscando elucidar os feitos dessa planta na saúde e desenvolvimento de peixes (AWAD et al., 2015; BAHİ et al., 2017; GUARDIOLA et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; PAUL et al., 2004; ROOHI et al., 2017); ratos (MOHAMAD et al., 2004; BIN-HAFEEZ et al., 2003; HANNAN et al., 2003; KHOSLA; GUPTA; NAGPAL, 1995; VATS; GROVER; RATHI, 2002) e humanos (BOLSONNI et al., 2008; KAVIARASAN; VIJAYALAKSHMI; ANURADHA, 2004; SUR et al., 2001; RAGHURAM et al., 1994).

Dentre os estudos realizados, esta planta apresenta efeito antioxidante devido à sua composição rica em polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, saponinas (como diosgenina e yamogenina), alcaloides (como trimetilamina, neurina, trigonelina, etc.), taninos, carotenoides (CHATTERJEE; VARIYAR; SHARMA, 2009; DIXIT et al., 2005; KAVIARASAN; VIJAYALAKSHMI; ANURADHA, 2004; KUMARI, SINHA, 2012; GIRARDON et al., 1985; GUPTA; NAIR, 1999; NAIDU et al., 2011; RUBY et al., 2005; SAXENA et al., 2011; SOWMYA; RAJYALAKSHMI, 1999; UEMURA et al., 2011).

Estudos *in vivo* em diversas espécies e *in vitro* avaliaram sementes germinadas, extratos de sementes de feno grego e sementes *in natura* adicionadas na dieta e mostraram que ambos apresentam alto potencial antioxidante (BHANGER; BUKHARI; MEMON, 2008; BHATIA et al., 2006; SAEED et al., 2013; KTARI et al., 2017; PASRICHA; GUPTA, 2014; SUBHASHINI; THANGATHIRUPATHI; LAVANYA, 2011; SUBHASHINI; THANGATHIRUPATHI; LAVANYA, 2011).

Em um estudo com Dourada (*Sparus aurata*) durante 8 semanas de alimentação com inclusão de 0 %, 1 %, 5 % e 10 % de sementes de feno grego na dieta, foi observado atividade antioxidante no muco (GUARDIOLA et al., 2018b). Ao administrar dietas com inclusão de 0 %, 2 % e 5 % de sementes de feno grego, Guardiola et al. (2017a), relataram elevada atividade antioxidante no filé de dourada.

Antache et al. (2014) forneceram dietas com 0 % e 1 % feno grego para tilápias do Nilo e observaram melhoras na imunidade e redução da glicemia. GÜLTEPE et al. (2014)

também forneceram sementes de feno grego na dieta de tilápias, com 1 % de inclusão e além de observarem melhora nos índices sanguíneos, também concluíram que o feno grego aumenta a atividade da lisozima sérica. Em um estudo com robalos (*Dicentrarchus labrax*), houve melhoras no *status* hematológico e imunológico após a suplementação de feno grego com inclusão de 1 % na dieta (YILMAZ; ERGÜN; ÇELIK, 2014).

Estudos realizados recentemente pela Universidade de Murcia (Espanha) em parceria com a Universidade de Monastir (Tunísia) e com a Universidade de Porto (Portugal), tem mostrado que a inclusão de feno grego sozinho ou em combinação com os probióticos podem aumentar o desempenho de crescimento, melhorar vários parâmetros imunes humorais, aumentar a expressão de genes imuno-relacionados e aumentar a capacidade antioxidante no filé e no muco de douradas (AWAD et al., 2015; BAHÍ et al., 2017; GUARDIOLA et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b).

Syed et al. (2018) forneceram 4 dietas contendo sementes de feno grego (0 %, 0,5 %, 1 % e 1,5 %) para alevinos de *Cyprinus carpio* durante 8 semanas, e concluíram que a dieta contendo 1 % de inclusão apresentou maior efeito sobre o ganho de peso dos animais e a de 0 % menor efeito. Este mesmo efeito também foi evidenciado por Zaki et al. (2012), que testaram a inclusão (0 %, 1 % e 2 %) de diversas plantas medicinais na dieta de tilápia do Nilo, entre elas, a semente de feno grego e farinha de broto de feno grego. Os resultados mostram que a farinha de broto de feno grego (1 %) apresentou maiores valores de desempenho de crescimento e de conversão alimentar, seguida de sementes de feno grego (1 %), sendo superiores às demais plantas testadas e à dieta controle. Utilizando os mesmos níveis de inclusão Abdelhamid e Soliman, (2012), observaram que a adição de 2 % aumentou o percentual de proteína na carcaça de tilápias do Nilo, assim como promoveu melhores índices zootécnicos (crescimento, conversão alimentar, eficiência proteica, e utilização de energia).

De fato, a utilização desta planta como suplemento na alimentação de peixes é promissor e estudos para elucidar seus efeitos sobre a fisiologia de peixes, em especial a tilápia do Nilo, importante espécie de peixe para aquicultura mundial e nacional são relevantes e necessários para o crescimento sustentável dos sistemas de produção aquícolas. Mesmo a tilápia sendo um animal resistente e rustico, quando submetida a excessivos manejos, combinado com água de má qualidade e alimentação não balanceada, pode apresentar quadros de estresse oxidativo, assim como ataques de patógenos. Para evitar que haja prejuízos na produção, o feno grego é uma alternativa para garantir o bom desempenho dos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino e Pesquisa em Piscicultura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos – PR. Espécimes de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) provenientes de piscicultura comercial, foram transportados e mantidos nas instalações, onde o estudo foi desenvolvido.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná do *Campus* Dois Vizinhos (protocolo nº 2018-41).

4.2 Preparo das dietas

Sementes de feno grego (*T. foenum graecum*) foram compradas de um mercado local em Curitiba (Brasil) e trituradas num moinho de facas no Laboratório de Sementes, pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos – PR. Foi utilizada uma mistura de ração comercial (Anhambí Alimentos[®] Itapejara do Oeste, PR), suplementada com 1 % de semente de feno grego (T1); 2 % de semente de feno grego (T2) e a dieta controle (T0) e extrusadas na UNEPE de piscicultura, o qual possui uma máquina extrusora com capacidade de 40 kg/hora, acoplada com esteira rotativa com sistema de aquecimento elétrico para secagem de ração.

Após extrusão, as dietas experimentais foram analisadas para matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra bruta (FB) e matéria mineral (MM) de acordo com os métodos preconizados pela *Association of Official Analytical Chemist*.

A proteína bruta (N x 6,25) foi determinada pelo método Kjeldahl, matéria seca determinada em estufa a 105°C, a matéria mineral em forno mufla de 550-600°C. A fibra bruta determinada pela digestão ácido/básica e o extrato etéreo em extrator Ankon[®] (XT15) (Tabela 1). A análise centesimal das dietas foi executada no Laboratório de Bromatologia da UTFPR, *Campus* Dois Vizinhos. Por fim, as dietas foram embaladas em recipientes plásticos hermeticamente fechados e armazenadas (-20°C) até sua utilização.

Tabela 1 – Composição química das dietas fornecidas com base na matéria orgânica

Nutriente	Nível de inclusão de Feno grego			
	Ração 0 % de inclusão	Ração 1 % de inclusão	Ração 2 % de inclusão	Feno Grego
	%	%	%	%
Proteína bruta	34,98 ±0,51	35,02 ±0,39	36,11 ±0,59	29,03 ±0,14
Energia bruta	10,74 ±0,37	10,95 ±0,29	11,02 ±0,10	16,83 ±3,16
Fibra bruta	4,68 ±0,70	5,47 ±0,40	5,26 ±0,56	9,49 ±0,56
Matéria seca	85,11 ±0,14	90,37 ± 0,11	89,56 ±0,08	89,74 ±0,15
Matéria mineral	9,64 ± 0,07	9,36 ±0,08	9,54 ±0,17	3,22 ±0,03

4.3 Arranjo experimental

Os peixes foram sedados em solução de benzocaína (1:10.000), para posterior pesagem e separação em grupos de dez exemplares distribuídos, em um delineamento inteiramente casualizado, em 12 caixas circulares de polietileno de 250 L, sendo três tratamentos e quatro repetições. As caixas permaneceram conectadas a um sistema fechado de recirculação de água, com filtragem biológica, providos de aeração forçada e temperatura controlada por meio de aquecedores. Os animais foram aclimatados por 7 dias antes do início do experimento. Durante 45 dias as dietas experimentais foram fornecidas aos peixes duas vezes ao dia (9h00m e 17h00m) até aparente saciedade e a quantidade distribuída para cada caixa registrada.

Os parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura, amônia tóxica e oxigênio dissolvido) foram mensurados todos os dias sempre as 15h00m e estavam dentro dos valores considerados ideais para a tilápia do Nilo, segundo El-Sayed (2006).

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água

Parâmetros	O ₂ D	pH	Temperatura	Amônia tóxica
	Mg/L		°C	mg/L
Média	6,81	5,81	27,03	0,53
Desvio Padrão	1,35	0,70	1,04	0,26

4.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Ao final do experimento (45 dias), os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, em seguida todos foram sedados (solução de benzocaína 1:10.000). O perfil hematológico dos animais foi realizado por meio da punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas de 3 mL.

4.4.1 Estimativa da concentração de hemoglobina

Para realização desta análise, foi adotado o método da cianometahemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973), em que 0,01 mL (10 μ L) de sangue com EDTA foram diluídos em 2,5mL de cianeto, após 10 minutos a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, em seguida 600 μ L do sobrenadante foram recolhidos para leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm e os resultados expressos em g/100mL.

4.4.2 Valor do hematócrito

Amostras sanguíneas homogeneizadas com heparina foram introduzidas em capilares para microhematócrito e uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm em centrífuga de microhematócrito (GOLDEFARB et al., 1971) e a avaliação feita com auxílio da tabela de microhematócrito e expressa como $\text{Vol.}_{\text{eritrócitos}} / 100 \text{ cm}^3$.

4.4.3 Contagem total de eritrócitos

Para a contagem de eritrócitos, alíquotas de sangue com EDTA foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,01 mL de sangue para 2,0 mL do diluente formol citrato. Após homogeneização da solução a contagem foi feita em câmara de Neubauer. Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara, calculado a média das duas contagens e o resultado expresso em $\text{Num}_{\text{eritrócitos/leucócitos}} / \text{mm}^3$.

4.4.4 Variáveis hematimétricas: VCM, HCM, CHCM

As variáveis hematimétricas foram determinadas de acordo com Wintrobe (1934) através dos seguintes cálculos:

Volume corpuscular médio:

$$\text{VCM (f-L)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Eritrócitos}}$$

Hemoglobina corpuscular média:

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Concentração de Hemoglobina} \times 10}{\text{Eritrócitos}}$$

Concentração de hemoglobina corpuscular média:

$$\text{CHCM (g/dL)} = \frac{\text{Concentração de hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

4.5 Avaliação de parâmetros imunológicos

A avaliação dos parâmetros imunológicos dos peixes foi realizada por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas e agulhas descartáveis sem anticoagulantes, e separados em dois tubos tipo eppendorf, um previamente umedecido com heparina e outro com EDTA. Amostra de sangue com EDTA permaneceu em temperatura ambiente por 4 horas para posterior centrifugação (600 rpm por 10 minutos) e obtenção do plasma, que após foi congelado para análise de lisozima plasmática.

4.5.1 Atividade respiratória dos leucócitos – *burst* oxidativo

O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio produzidos no *burst* oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma um precipitado de material insolúvel com coloração azul escuro no interior dos fagócitos, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Para dosagem do precipitado 0,1 mL do sangue total com heparina foi adicionado a 0,1 mL de *nitroblue tetrazolium* (NBT, Sigma, St Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foram colocados em um tubo de vidro com 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA)

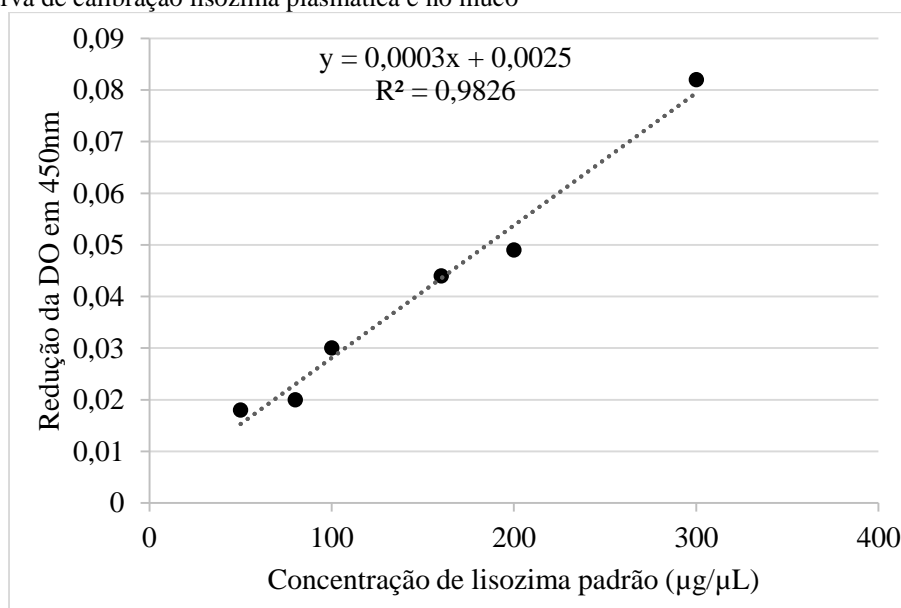
e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Em seguida foi realizado a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

4.5.2 Concentração de lisozima plasmática

Utilizando o plasma dos peixes e por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Abreu et al. (2009), foi realizada a concentração de lisozima plasmática.

Antes de determinar a concentração de lisozima das amostras de plasma dos peixes, foi realizada a curva padrão de calibração (Figura 1) pela quantificação das diferenças de densidades ópticas iniciais e finais (ΔDO) de diferentes concentrações de lisozima padrão (Sigma L 6876). Para determinar a curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de lisozima padrão 10, 20, 30, 40, 50 60, 70, 80 μL para diferentes concentrações de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 ; 0,05M; pH 6,2) 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120 μL respectivamente 200 μL , em suspensão de 200 μL de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria diluída em 50 mL de tampão fosfato de sódio), mensurados em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Um branco foi realizado contendo apenas tampão fosfato (600 μL). A partir da curva determinada, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO . Para tal, as amostras sanguíneas serão centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) para obtenção do plasma e armazenadas a (-20°C) para posterior análise.

Figura 1 - Curva de calibração lisozima plasmática e no muco



As amostras de plasma foram submetidas ao tratamento térmico (banho maria a 56°C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, em seguida foram adicionadas em uma cubeta de 1,0 mL e pipetado 150 µL de plasma ao qual foi adicionado 150 µL de tampão fosfato de sódio e em seguida incubada a 26°C por dois minutos. Após esse período, foi adicionado mais 300 µL da suspensão de *M. lysodeikticus* totalizando um volume final de 600 µL. A redução da densidade óptica (ΔDO) em 450 nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26°C. Os resultados expressos em µg/mL de plasma.

4.5.3 Concentração de lisozima no muco

Para a coleta do muco foi utilizado o protocolo proposto por Ross e Moldeus (1991). Os peixes foram sedados com benzocaína e transferidos para embalagens plásticas contendo 5 mL de solução contendo 100 mM de bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3), pH 7,8 e massageados durante um minuto.

O extrato com muco foi transferido para tubos tipo Falcon, e centrifugado (2730 rpm) durante 15 minutos para a remoção de escamas e outros materiais insolúveis, congelados a -20°C e então liofilizados para posterior análise da concentração de lisozima do muco.

Para a determinação da concentração de lisozima no muco, o extrato do muco liofilizado foi ressuspensão em igual volume de tampão fosfato e seguiu o mesmo procedimento da análise realizada no plasma (item 4.6.2).

4.5.4 Proteína total plasmática

Para a análise da proteína plasmática, foi utilizado o plasma dos capilares para microhematócrito após a centrifugação. A concentração total de proteína plasmática foi determinada por meio de um refratômetro portátil (WZ-301/Protein 0,0-12 g/dL) seguindo a metodologia utilizada por Sado et al. (2008).

4.6 Atividade antioxidante no filé

Para a determinação da atividade antioxidante no filé de tilápias, foram coletados os filés de três peixes de cada unidade experimental. Para tal, as tilápias foram eutanasiadas com uma dosagem alta de benzocaína. Em seguida as amostras foram congeladas (-20°C) para posterior liofilização (Modelo L101 - Liotop®) e moagem.

4.6.1 Preparo dos extratos dos filés

Para a preparação dos extratos foram utilizados aproximadamente $1,0000 \pm 0,0003$ g de amostra liofilizada e moída (peneira de 1 mm) e 10 mL de metanol. A mistura foi homogeneizada em 25°C a 250 rpm por 30 minutos, utilizando um Shaker de bancada (Incubadora Refrigerada Agitação Orbital Modelo 6430 Thoth®). Em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e armazenado protegido da luz a -8°C até sua utilização para determinação de sua capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH (eliminação de radicais livres) e seu teor de fenólicos totais.

4.6.2 Ensaio DPPH (eliminação de radicais livres)

O ensaio de atividade antioxidante utilizando o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se baseia na redução de um radical de coloração roxa (DPPH) em virtude da ação antioxidante da amostra, até coloração amarela. A capacidade de eliminação foi medida utilizando o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995) com modificações (MA et al., 2011).

Resumidamente, 25 µL dos extratos metanólicos dos filés foram adicionadas a 2 mL de uma solução metanólica de DPPH ($6,25 \times 10^{-5}$ mol/L), em seguida a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Após esse período foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) na faixa de 0-2000 µmol/L foram utilizados para a curva de calibração (Figura 2).

Os resultados foram expressos em µmol de Equivalente Trolox/g de amostra seca (µmolET/gAS). As análises de cada extrato foram realizadas em duplicata.

4.6.3 Teor de fenólicos totais (TPC)

TPCs dos extratos de filé foram analisados utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Para tal, 250 µL dos extratos metanólicos do filé foram adicionados a 250 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* (diluído em água destilada, 1:1 v/v), 500 µL de solução saturada de carbonato

de sódio e 4 mL de água destilada. Após 25 minutos em repouso e protegido da luz, a mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm e a absorbância foi lida num espectrofotômetro no comprimento de onda de 725 nm. Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de ácido gálico na faixa de 0-260 mg/L foram utilizadas para a curva de calibração (Figura 3).

Os resultados foram expressos como mg de Equivalentes de Ácido Gálico/g de amostra seca (mgEAG/gAS). As análises de cada extrato foram realizadas em duplicata.

Figura 2 – Curva de calibração do ensaio DPPH (eliminação de radicais livres)

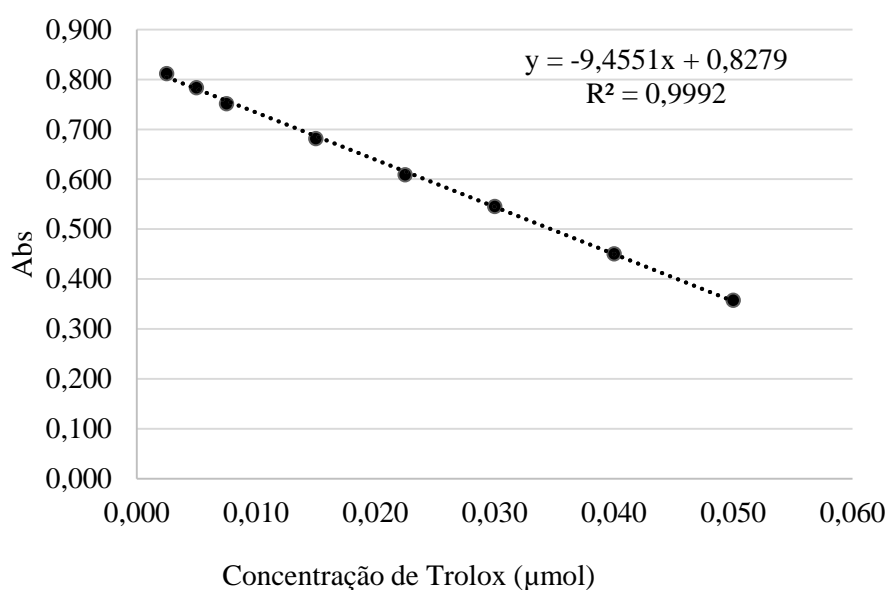
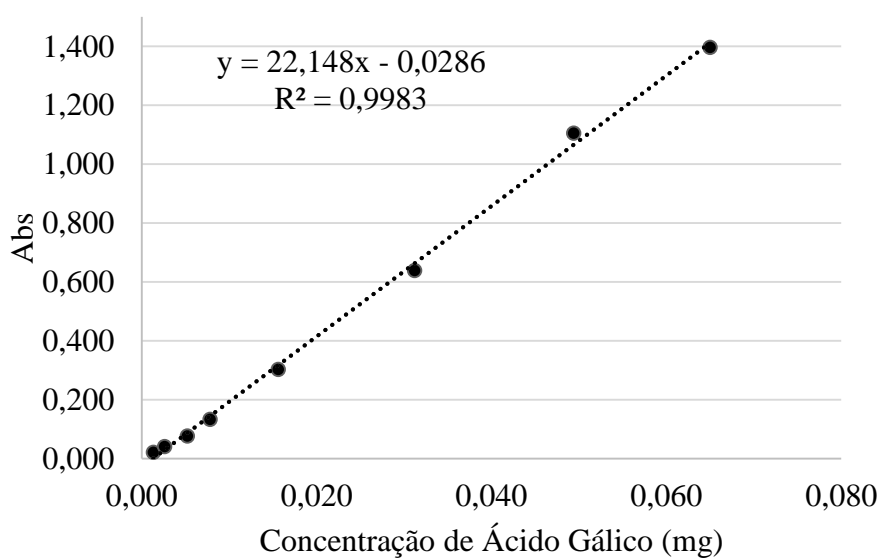


Figura 3 – Curva de calibração para Teor de fenólicos totais.



4.7 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico

Os animais ainda sedados foram pesados e medidos. O desempenho dos juvenis de tilápia do Nilo alimentados com as três dietas foi avaliado considerando-se os seguintes parâmetros NRC (2011):

- Ganho de peso (g)(GP):

$$GP = Pf - Pi$$

- Consumo de ração (CR);
- Índice de conversão alimentar:

$$ICA = \frac{CR}{GP}$$

- Taxa de crescimento específico:

$$TCE = \frac{100 \times (Pf - Pi)}{t}$$

Onde: Pf =peso final (g); Pi =peso inicial (g); t =período experimental (dias).

4.8 Análise estatística

A avaliação dos efeitos da inclusão da semente de feno grego na dieta sobre os parâmetros de desempenho, hematológicos, imunológicos e atividade antioxidante no filé de juvenis de tilápia do Nilo foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Quando identificadas diferenças significativas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros hematológicos e imunológicos

Os resultados das análises para os parâmetros hematológicos e imunológicos apresentam-se sumarizados na tabela 3. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) nos parâmetros hematológicos e imunológicos dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com diferentes níveis de inclusão de feno grego.

Parâmetros	% de Feno grego /kg de dieta			P - valor
	0 %	1 %	2 %	
Hematócrito (%)	32,63 ±7,18	30,69 ±4,61	31,44 ±5,29	0,6379
Hemoglobina (g/dL)	8,12 ±1,59	7,57 ±1,31	7,98 ±1,38	0,5280
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	3,25 ±0,31	3,14 ±0,42	2,94 ±0,39	0,0764
VCM* (f-L)	104,01 ±28,59	97,28 ±15,24	109,55 ±28,30	0,3962
HCM** (pg/cel)	24,84 ±6,12	24,00 ±2,74	27,78 ±7,04	0,1595
CHCM*** (g/dL)	25,52 ±5,74	25,15 ±5,52	25,57 ±3,59	0,9672
Burst Oxidativo (Abs)	0,75 ±0,14	0,79 ±0,05	0,77 ±0,03	0,4298
Proteína total (g/dL)	5,33 ±0,48	5,39 ±0,56	5,26 ±0,45	0,7600
Lisozima muco (μg/mL)	76,07 ±103,20	48,35 ±30,10	54,30 ±41,98	0,4831
Lisozima plasma (μg/mL)	142,75 ±94,82	169,58 ±79,48	151,49 ±95,26	0,7161

Análise de variância com significância ao nível de 95 % ($p < 0,05$)

*Volume corpuscular médio. **Hemoglobina corpuscular média. ***Concentração de hemoglobina corpuscular média

5.2 Atividade antioxidante no filé

Os resultados das análises do ensaio DPPH (eliminação de radicais livres) e de Teor de fenólicos totais realizados em filés de tilápia do Nilo suplementadas com diferentes níveis de feno grego são apresentados na Tabela 4.

Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) para os parâmetros avaliados nos filés de tilápias do Nilo.

Tabela 4 - Potencial antioxidante em filés de tilápia do Nilo com inclusão de diferentes níveis de feno grego.

Amostras	Fenólicos Totais	DPPH*
	mg EAG/g AS	μmol ET/g AS
Filé 0 %	0,28 ±0,02	12,44 ±0,64
Filé 1 %	0,29 ±0,03	12,04 ±0,64
Filé 2 %	0,28 ±0,03	12,30 ±0,75
P - Valor	0,8890	0,3549

Análise de variância com significância ao nível de 95 % (p<0,05)

*(1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Os resultados das análises do ensaio DPPH (eliminação de radicais livres) e de Teor de Fenólicos totais realizados nas dietas experimentais, bem como da mistura da ração controle antes da extrusão e de sementes de feno grego são apresentados na Tabela 5.

Não foi observado efeito significativo (p>0,05) para a análise de teor de fenólicos totais avaliado nas amostras. Para a análise de DPPH, a Mistura da Ração, Ração 0% e Ração 2% apresentaram maior (p<0,05) teor antioxidante quando comparadas à Ração 1%.

Tabela 5 - Potencial antioxidante das dietas experimentais, mistura da ração controle antes da extrusão e de sementes de feno grego*.

Amostras	Fenólicos Totais	DPPH
	mg EAG/g AS	μmol ET/g AS
Mistura Ração	0,85 ±0,20	12,53 ±0,47 A
Ração 0 %	0,78 ±0,001	11,98 ±0,04 A
Ração 1 %	0,76 ±0,04	10,20 ±0,26 B
Ração 2 %	0,67 ±0,07	12,27 ±0,07 A
Feno Grego	0,69 ±0,10	9,97 ±0,07
P- Valor	0,4902	0,0356

Análise de variância com significância ao nível de 95 % (p<0,05)

*A análise de variância foi realizada apenas entre as dietas experimentais e a mistura da ração.

Diferentes letras na mesma coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0,05)

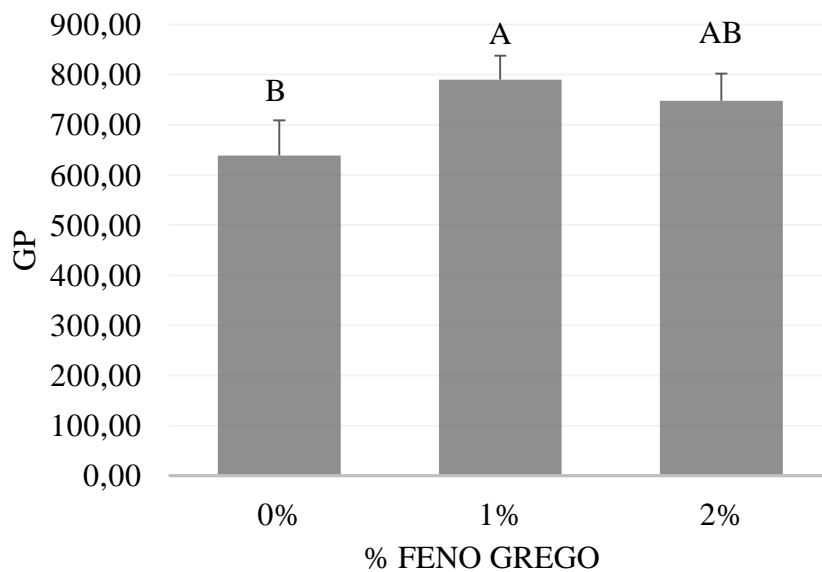
5.3 Parâmetros indicadores de desempenho zootécnico

Os resultados encontrados para os parâmetros de desempenho são apresentados a seguir. A análise de variância detectou efeito significativo dos tratamentos sobre os

parâmetros ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e índice de conversão alimentar (ICA).

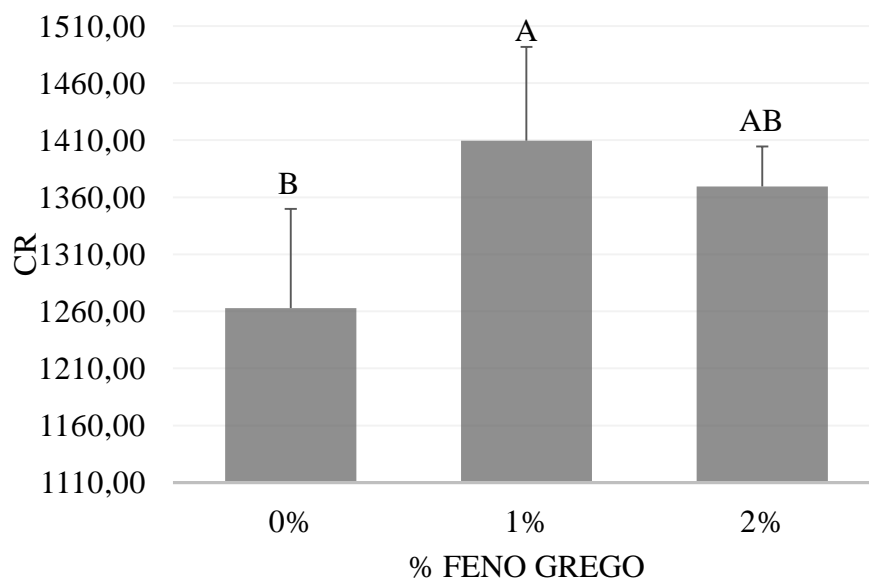
Os peixes alimentados com inclusão de 1 % de feno grego apresentaram maior ganho de peso (GP) e maior consumo de ração (CR), quando comparados com o grupo controle. Já os do grupo alimentados com ração de 2 % de inclusão são estatisticamente iguais aos do grupo controle (Gráfico 1, Gráfico 2).

Gráfico 1 Relação entre o ganho de peso (GP) e níveis de inclusão (%) de feno grego. ($P= 0,0135$)



Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

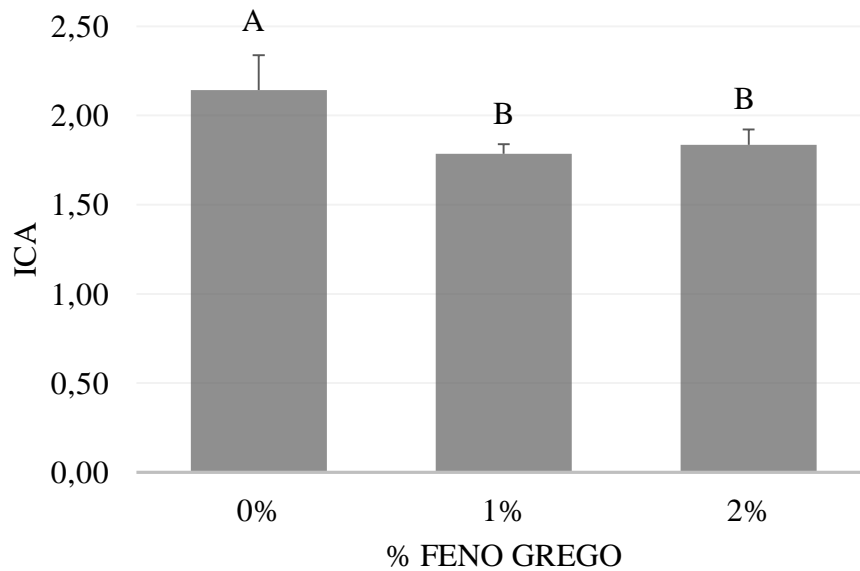
Gráfico 2 – Relação entre o consumo de ração (CR) e níveis de inclusão (%) de feno. ($P= 0,0454$)



Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os animais suplementados com feno grego apresentaram melhores índices de conversão alimentar quando comparados ao grupo controle (Gráfico 3).

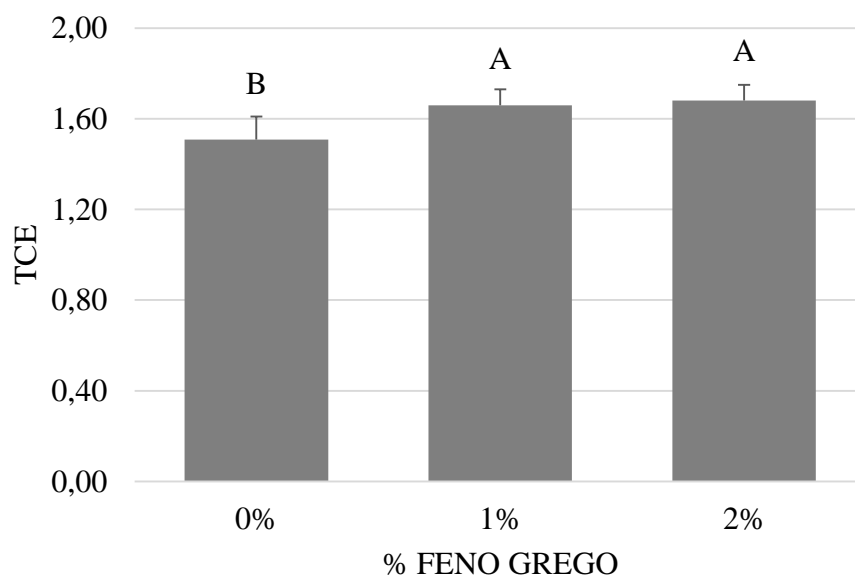
Gráfico 3 – Relação entre o índice de conversão alimentar (ICA) e níveis de inclusão (%) de feno grego. ($P=0,0087$)



Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Os resultados para TCE são apresentados no gráfico 4. Não houve efeito dos tratamentos para este parâmetro.

Gráfico 4 – Relação entre a taxa de crescimento específico (TCE) e níveis de inclusão (%) de feno grego. ($P=0,0401$)



Diferentes letras acima de cada coluna denotam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

6 DISCUSSÃO

Neste estudo os parâmetros hematológicos e imunológicos não foram afetados pela inclusão de diferentes níveis de feno grego, porém diferentes do resultados encontrados em outros trabalhos internacionais, em que a inclusão de 1 % de feno grego melhorou a imunidade de tilápias do Nilo (ABDEL et al., 2009; ANTACHE et al., 2014; GÜLTEPE et al., 2014; ZAKI et al., 2012), de robalos (YILMAZ et al., 2016) e de carpas (SYEED et al., 2018).

Trabalhos conduzidos na Europa por Guardiola et al. (2017a; 2018a; 2018b) e por Awad, Cerezuela, Esteban (2015) com inclusões de 0 %, 1 %, 5 % e 10 % de feno grego na dieta de douradas, concluíram que todas as doses de inclusão apresentaram efeitos para a atividade do *burst* respiratório. Já o tratamento de 5 % de inclusão apresentou melhores resultados para atividade antiprotease e atividade do sistema complemento. A dose de 1 % apresentou aumento no leucograma, já a inclusão de 10 % apresentou aumento na atividade peroxidase e protease, bem como aumento no nível de IgM, maior peso final, GP, TCE e comprimento; e melhor ICA.

A principal função do sistema imunológico é manter a saúde e prevenir as lesões oriundas do estresse oxidativo que é causado pela produção excessiva de EROs (GUARDIOLA et al., 2017a). Neste estudo adição de feno grego não apresentou resultados de atividade antioxidante no filé, entretanto, trabalhos mostram que a inclusão de feno grego isoladamente ou em combinação com cepas probióticas apresentou efeito antioxidante no muco e músculo da dourada (GUARDIOLA et al., 2017a; GUARDIOLA et al., 2018b). Com os resultados obtidos de DPPH e TPC do extrato de semente de feno grego, é possível perceber que esta planta possui alta atividade antioxidante, no entanto para que os compostos atuem no organismo animal, é necessário que eles apresentem interação positiva entre os compostos dos outros alimentos contidos na ração, bem como os antioxidantes sintéticos que são acrescidos na ração comercial.

Os antioxidantes sintéticos podem apresentar ação sinérgica, aditiva ou antagônica aos antioxidantes naturais. (LU; FOO, 1999; SONAM; GULERIA, 2017). Essas possíveis interações entre o feno grego e antioxidantes ainda não foram estudadas, sendo necessários mais estudos sobre a influência desses compostos. Outra explicação para os resultados obtidos é em relação ao processo de extrusão da ração, pois os compostos antioxidantes ao serem expostos a temperaturas elevadas, podem ser perdidos durante o processo (POKORNÝ; SCHMIDT, 2001), desta forma, essa característica pode explicar os resultados encontrados

para as análises de DPPH, em que rações contendo 1% de feno grego foram inferiores ao controle. Também é possível que os efeitos antioxidantes gerados pelo feno grego, tenham sido utilizados pelos animais para liberar toxinas e corpo, bem como melhorar a saúde, e com isso apresentaram melhores resultados de desempenho (MANDHARE et al., 2016).

Compostos naturais (derivados principalmente de leveduras e extratos de ervas, os chamados fitobióticos) são capazes de modular a microbiota intestinal, favorecendo o desenvolvimento de bactérias benéficas e inibindo microrganismos potencialmente patogênicos. Desta forma, estudos sobre o efeito destes compostos têm sido realizados, pois estas estratégias têm a vantagem de serem facilmente aplicáveis na fábrica de ração em grandes volumes de ração e evitam grandes adaptações dos protocolos de produção na fazenda (COUTTEAU, 2010). Estudos com extratos de palmitos, gengibre e feno grego tem sido realizados buscando identificar seus efeitos como potenciais imunestimulantes, promotores de crescimento e com propriedades antimicrobianas como alternativas eficazes para produtos sintéticos (CEREZUELA et al., 2016; SUKUMARAN; PARK; GIRI, 2016), pois os fitoterápicos são baratos, e seus compostos orgânicos não causam ameaça aos peixes ou à saúde humana (GUARDIOLA et al., 2017a).

Estudos com feno grego, mostram que as fibras mucilaginosas presentes nas sementes aumentam a viscosidade do intestino, contribuindo na eficiência do muco como barreira contra patógenos que podem diminuir o desempenho animal (MADAR; SHOMER, 1990, RAJU, et al., 2001). A atividade bactericida do feno grego foi avaliada com douradas na Espanha. Os peixes que receberam suplementação de feno grego combinado com cepas probióticas apontaram efeito inibitório no crescimento de bactéria patogênica. (GUARDIOLA et al., 2017b). Isso sugere que os animais que receberam as dietas suplementadas com feno grego, tiveram sua microbiota intestinal alterada, em que a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos favoreceu a população benéfica (bactérias ácido lácticas e *Bacillus* spp), por consequência, melhora a absorção dos nutrientes, por isso apresentaram melhor desempenho (SANG et al., 2011; SONG et al., 2014).

Os resultados encontrados neste estudo para GP estão em concordância com os resultados obtidos no Egito, em que tilápias do Nilo foram alimentadas com inclusão de 0 %, 1 % e 2 % de feno grego e apresentaram diferenças significativas para GP com o tratamento de 1 % de inclusão (ZAKI et al., 2012).

Esses resultados podem ser atribuídos à eficiência conhecida das sementes de feno grego em melhorar a digestão de proteínas e absorção de gorduras (MANSOUR; EL ADAWY, 1994). Esses resultados também foram evidenciados num estudo na Índia, em que carpas suplementadas com sementes de feno grego apresentaram melhores resultados para GP quando comparadas ao grupo controle (Syeed et al., 2018). Resultados semelhantes também foram encontrados por Abdel, et al. (2009), Bahi et al. (2017), Paul et al. (2004), Yilmaz, Ergün, Çelik, (2016) e Zaki et al. (2012).

Entretanto estudos com inclusões de 0 %, 1 %, 5 % e 10 % de feno grego na dieta de douradas mostraram que quanto maior a dose fornecida aos animais, melhor foram os resultados de ganho de peso (AWAD; CEREUZUELA; ESTEBAN, 2015), o que significa que neste estudo foi utilizada uma subdosagem de inclusão de feno grego, que embora baixa, mostrou efeito sobre o GP. Com níveis de inclusões maiores, também pode haver ganhos no fornecimento de aminoácidos, vitaminas e minerais, já que o feno grego é rico em lisina, globulina, histidina, albumina e lecitina (MATHUR P, CHOUDHRY, 2009), bem como quantidades consideráveis de vitamina A, B₁, B₂, C, niacina, colina, biotina, tiamina, riboflavina, ácido fólico e ácido nicotínico (SRINIVASAN, 2006; SHARMA, 1986; LEELA, SHAFEEKH, 2008) e contém também em sua composição cálcio, ferro, zinco e enxofre (EL NASRI; EL TINAY, 2007; JANI; UDIPI; GHUGRE, 2009).

O feno grego pode aumentar a secreção da bile e da lipase pancreática, que exercem papel importante na digestão e absorção de gordura (PLATEL; SRINIVASAN, 2000). O ICA dos animais suplementados com feno grego na dieta foi melhor quando comparado ao controle, corroborando com os resultados encontrados por Abdel et al. (2009) em que tilápias do Nilo alimentadas com a inclusão de 0 %; 0,5 %; 1 % e 1,5 % de sementes de feno grego apresentaram valores de conversão alimentar de 2,46; 2,39; 1,90 e 1,94 respectivamente. Resultados semelhantes foram verificados por Syeed et al. (2018) em que carpas alimentadas com os mesmos níveis de inclusão apresentaram valores de ICA de 1,60; 1,40; 1,0 e 1,20 respectivamente. Em estudo realizado por Zaki et al. (2012) a inclusão de sementes de feno grego na dieta de tilápia do Nilo apresentou resultados maiores de ICA do que os peixes alimentados com farinha de broto de feno grego, porém menores do que os peixes do grupo controle.

A taxa de crescimento específico não apresentou diferenças significativas para este estudo, no entanto estudos mostram que a inclusão que feno grego em níveis de 0,5 % a 1,5 % apresentam melhores resultados para TCE quando comparados ao controle (ABDEL et al., 2009, BAHY et al., 2017; PAUL et al., 2004; SYEED et al., 2018; ZAKI et al., 2012).

Os resultados para CR encontrados neste estudo são semelhantes aos publicados por Abdel et al. (2009) em que tilápias do Nilo alimentadas com 1 % de feno grego na dieta tiveram maior CR dos que os demais grupos. Syeed et al. (2018) alimentaram carpas com níveis de 0 %, 0,5 %, 1 % e 1,5 % de feno grego, e obtiveram melhores resultados para CR com os animais suplementados quando comparados ao grupo controle.

A melhora nos índices de desempenho se deve ao fato do feno grego possuir em sua composição polifenóis, flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, saponinas alcaloides, taninos e carotenoides, que estimulam a síntese de ácidos biliares e enzimas pancreáticas, bem como favorecem a saúde intestinal (FRANKIČ et al., 2009; GURKAN et al., 2015; YLMAZ; SEBAHATTIN; CELIK, 2012). Devido à melhora na saúde intestinal, os peixes são menos expostos às toxinas de origem microbiológica, dessa forma, além de aumentar a resistência dos animais, contribuem para melhor crescimento e a sobrevivência (FRANKIČ et al., 2009).

Analisando os estudos realizados com a inclusão de feno grego na dieta de tilápias e outras espécies, esperava-se que as dietas fornecidas às tilápias apresentasse efeito imunomodulador e efeito antioxidante, além dos demais resultados satisfatórios para desempenho. No entanto, os resultados indicam que embora não tenham melhorado a saúde dos animais, o feno grego foi capaz de melhorar o desempenho. Os resultados distintos dos demais trabalhos são oriundos de fatores que diferenciam os estudos, como condições edafoclimáticas, categoria animal, tempo de administração, sistema de criação e até mesmo, pela origem do feno grego ser desconhecida.

7 CONCLUSÃO

Embora não tenham apresentado diferenças significativas para melhoras na imunidade e efeito antioxidante, os resultados indicam que a inclusão de feno grego na dieta de tilápias do Nilo não causam danos à saúde do peixe, fato evidenciado pelos resultados hematológicos e imunológicos, podendo ser fornecido como aditivo alimentar para melhores resultados de desempenho zootécnico, principalmente quando os animais estiverem em ambientes não favoráveis ao bom desenvolvimento de suas funções básicas. Mais estudos são necessários para determinação da dose ideal de inclusão, bem como o tempo de administração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL, A., et al. Effect of using dried Fenugreek seeds as natural feed additives on growth performance, feed utilization, whole-body composition and entropathogenic *Aeromonas hydrophila*-challenge of monsex Nile tilapia *O. niloticus* (L) fingerlings. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3 n. 2, p. 1234-1245, 2009.
- ABDELHAMID, A. M.; SOLIMAN, A. A. A. Possibility of using fenugreek seeds or cresson seeds in tilapia diets. **Journal Arabian Aquaculture. Society**, Alexandria, v. 7, p. 75-90, 2012.
- ABREU J. S., et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Bioliology**. v. 69, p. 1133, 2009.
- ACHARYA, S. N; THOMAS, J. E; BASU, S. K. Fenugreek, an alternative crop for semiarid regions of North Americ. **Crop Science**. Madison, v. 48, n. 3, p. 841-853, 2008.
- ADEL, M. et al. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white Fish (*Rutilus frisii kutum*). **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 841-847, 2015.
- ALEXANDER J. B., INGRAM G. A. Noncellular nonspecific defense mechanisms of Fish. **Annual Review of Fish Diseases**. Oxford, v. 2, p. 249-279, 1992.
- ANDRADE, P. F. **Avaliação do prazo de vida comercial do atum (*Thunnus atlanticus*) armazenado sob refrigeração**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.
- ANTACHE, A. et al. Effects of dietary supplementation at Nile tilapia with *Thymus vulgaris*, *Trigonella foenum graecum* and *Azadirachta indica* on welfare status. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies**. Cluj-Napoca, v. 71, n. 2, p. 115-122, 2014.
- ANUTA, J. D. et al. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (Vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the world aquaculture society**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 834-844, 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos - Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, modificado em 12 de outubro de 2014. Brasília: MAPA, 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#>. Acesso em: 07 jan. 2019.
- AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 67, p. 40-54, 2017.
- AWAD, E.; CERZUELA, R.; ESTEBAN, M. Á. Effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune status and growth performance. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 454-464, 2015.

- BAHI, A. et al. Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 60, p. 50-58, 2017.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BHANGER, M. I.; BUKHARI, S. B.; MEMON, S. Antioxidative activity of extracts from a Fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*). **Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry**. Jamshoro, v. 9, n. 2, p. 6, 2008.
- BHATIA, K. et al. Aqueous extract of *Trigonella foenum graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. **Food and chemical toxicology**. Oxford, v. 44, n. 10, p. 1744-1750, 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.
- BIN-HAFEEZ, B. et al. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. **International immunopharmacology**. Oxford, v. 3, n. 2, p. 257-265, 2003.
- BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of fish Biology**, London, v. 5, p. 771 -781, 1973.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**. Québec, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOASCARDIN, N. R. A produção aquícola brasileira, *in*: OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J. R., SOTO, D. (org.) **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília, cap. 1, 2008.
- BOLSONNI, A. K. et al. O uso de espécies vegetais como fitoterápicos hipoglicemiantes. Espírito Santo, **[Internet]**, v. 1, n. 6, p. 19-23, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M-E; BERSET, C. L. W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**. Oxford, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CABELLO, F. C. et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental microbiology**. Oxford, v. 15, n. 7, p. 1917-1942, 2013.
- CEREZUELA, R. et al. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with palm fruit extracts and probiotics: effects on skin mucosal immunity. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 49, p. 100-109, 2016.

CHATTERJEE S, KUMAR M, AND KUMAR A. CHEMOMODULATORY. Effect of *Trigonella foenum graecum* (L.) Seed Extract on Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis. **Toxicol Int.** v. 19, n. 3, p. 287–294, 2012.

COUTTEAU, P. Application of novel feed additives based on botanical extracts to improve productivity and economics in aquaculture. In: Cruz-Suarez, L.E., et al. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 2010, San Nicolás de los Garza, N. L., México: **Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México**, p. 588-597, 2010.

DIXIT, P. GHASKADBI, S. MOHAN, H. DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds, **Phyther. Res.** 19. P. 977-983, 2005.

DONE, H. Y.; HALDEN, R. U. Reconnaissance of 47 antibiotics and associated microbial risks in seafood sold in the United States. **Journal of hazardous materials**, Amsterdam, v. 282, p. 10-17, 2015.

DOROJAN, O. G., et al. The influence of some phytobiotics (thyme, seabuckthorn) on growth performance of stellate sturgeon (*A. stellatus*, Pallas, 1771) in an industrial recirculating aquaculture system. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 47, n. 1, p. 205-210, 2014.

DOS SANTOS, A. C. et al. *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 62, p. 213-216, 2017.

ECOCROPE. In: FAO Food and agriculture organization of the united nations. **Base de dados Ecocrop**. 2017. Disponível em: <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/home>. Acesso em: 07 jan. 2019.

EL NASRI, N. A.; EL TINAY, A. H. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. **Food chemistry**, v. 103, n. 2, p. 582-589, 2007.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p. 291 -308, 1999.

EL-SAYED, A-F. M. **Tilapia culture**. Londres: CAB International, 2006.

EMEISH, W. F. A.; EL-DEEN, A. G. S. Immunomodulatory effects of thyme and fenugreek in sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*. **Assiut Veterinary Medical Journal**. Assiut, v. 62 n. 150, p. 1-7, 2016

ESTEBAN, M. A. et al. Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 39 (2), p. 532-540, 2014.

FAO, Programa de Informação de Espécies Aquáticas Cultivadas: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) –In: **FAO Food and agriculture organization of the united nations**, 2019. Disponível em:

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en. Acesso em: 03 jan. 2019.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture – Rome: **FAO Meeting the sustainable development goals**, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**. São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANKIČ, T., et al. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. **Acta Agric Slov**, v. 94, n. 2, p. 95-102, 2009.

GHEHDARIJANI, M. S. et al. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 49, p. 79-83, 2016.

GIRARDON, P. et al. Volatile constituents of fenugreek seeds. **Planta medica**. Nova Iorque, v. 51, n. 6, p. 533-534, 1985.

GOLDEFARB, P. B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**. Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.

GUARDIOLA, F. A. et al. Dietary administration effects of fenugreek seeds on skin mucosal antioxidant and immunity status of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 75, p. 357-364, 2018b.

_____. Effects of dietary administration of fenugreek seeds on metabolic parameters and immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 74, p. 372-379, 2018a.

_____. Effects of dietary supplementation with fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) skin mucosal immunity. **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 65, p. 169-178, 2017a.

_____. Quality and antioxidant response of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) to dietary supplements of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) alone or combined with probiotic strains. **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 63, p. 277-284, 2017b.

GÜLTEPE, N. et al. Effects of herbs and spice on health status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Streptococcus iniae*. **Acta Veterinaria**. Bruno, v. 83, n. 2, p. 125-131, 2014.

GURKAN, M. et al. Influence of three spice powders on the survival and histopathology of *Oreochromis mossambicus* before and after *Streptococcus iniae* infection. **Marine Science and Technology Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2015.

GUPTA, R.; NAIR, S. Antioxidant flavonoids in common Indian diet. **South Asian J Prev Cardiol**. Mumbai, v. 3, p. 83-94, 1999.

HANNAN, J. M. A. et al. Effect of soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum graecum* on glycemic, insulinemic, lipidemic and platelet aggregation status of Type 2 diabetic model rats. **Journal of ethnopharmacology**. Talca, v. 88, n. 1, p. 73-77, 2003.

HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. **Trends in Cell Biology**. Cambridge, v. 21, p. 569-576, 2011.

HEUZÉ V. et al. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). **Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO**. 2018. Disponível em: <https://www.feedipedia.org/node/242>. Acesso em: 02 jan. 2019.

JANI, R.; UDIPI, S. A.; GHUGRE, P. S. Mineral content of complementary foods. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 76, n. 1, p. 37-44, 2009.

JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. **Trends in food science & technology**. Sevilha, v. 9, n. 2, p. 62-72, 1998.

JIAN, J.; WU, Z. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). **Aquaculture**, Oxford, v. 218, n. 1-4, p. 1-9, 2003.

KAVIARASAN, S.; VIJAYALAKSHMI, K.; ANURADHA, C. V. Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. **Plant Foods for Human Nutrition**. Dordrecht, v. 59, n. 4, p. 143-147, 2004.

KHALAF, N. A. et al. Antioxidant activity of some common plants. **Turkish Journal of Biology**. Ankara, v. 32, n. 1, p. 51-55, 2008.

KHOSLA, P.; GUPTA, D. D.; NAGPAL, R. K. Effect of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on blood glucose in normal and diabetic rats. **Indian journal of physiology and pharmacology**. Cracóvia, v. 39, p. 173-173, 1995.

KLEIN, J. Immunology. Massachusetts: **Blackwell Scientific Publications Inc.**, 1990. p.311-334, 1990.

KREUTZ, L. C.; PIETRETTI, D.; DI DOMENICO, J. Imunoestimulantes para uso na aquicultura, in: BALDISSEROTO B. et al. (org.). **Farmacologia aplicada à aquicultura**. Santa Maria: UFSM, 2017. cap. 8.

KTARI, N. et al. Antioxidant and hemolytic activities, and effects in rat cutaneous wound healing of a novel polysaccharide from fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. **International journal of biological macromolecules**. Amsterdam, v. 95, p. 625-634, 2017.

KUBITZA, Fo. Aquicultura no Brasil. **Panorama da aquicultura**, v. 25, p. 10-23, 2015.

KUMARI, S., SINHA, M., 012. Hypoglycemic Effect of Fenugreek Incorporated Therapeutic Food on Selected Diabetic Subjects. **Department of Food and Nutrition: Pusa, Samastipur, Bihar 848, 125**. 2012

LEELA, N. K.; SHAFEEKH, K. M. Fenugreek, Chemistry of Spices. **CAB International, Pondicherry**, 2008.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2006.

LIU, Y.; KAKANI, R.; NAIR, M. G. Compounds in functional food fenugreek spice exhibit anti-inflammatory and antioxidant activities. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 131, n. 4, p. 1187-1192, 2012.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology**. Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

_____. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**. Amsterdam, v. 224, p. 164-175, 2014.

LU, Y.; FOO, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, Kidlington, v.65, n.1, p.1-8, 1999.

MA, X. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**. Oxford, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MADAR Z.; SHOMER I. Polysaccharide composition of a gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats. **J. Agricultural Food Chemistry**. v. 38, p. 1535-1539, 1990.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (Overview). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 137-151, 2006.

MANDHARE, T. A., et al. A review on astonishing benefits of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). **International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences**. Nova Iorque, v. 5, n. 4, p. 213-217, 2016.

MANSOUR, E. H. EL ADAWY, T. A. Nutritional potential and functional properties of heat-treated and germinated fenugreek seeds, **LWT-Food Sci Technol** v. 27, ed. 6, p. 568-572, 1994.

MARIA DO SOCORRO, M. R. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**. Amsterdam, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

MATHUR, P.; CHOUDHRY, M. Consumption pattern of fenugreek seeds in Rajasthani families. **J Hum Ecol**. v.25, p. 9-12, 2009.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado. **Revista Virtual de Química**, 2017, v. 9, n. 2, Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/>. Acesso em: 02 jan. 2019.

MEYER C., ed. Dicionário de Ciências Animais. 2019. [Online], França: **CIRAD**. Disponível em: <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/>. Acesso em: 03 jan. 2019.

MOHAMAD, S. et al. Lower doses of vanadate in combination with *Trigonella* restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats. **Clinica chimica acta**, Amsterdam, v. 342, n. 1-2, p. 105-114, 2004.

MOUSALLAMY, A.; SAMIR, A. Effect of using dried fenugreek seeds as natural feed additives on growth performance, feed utilization, whole-body composition and entropathogenic *Aeromonas Hydrophila*-challenge of monsex Nile tilapia *O. niloticus* (L) fingerlings. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1234-1245, 2009.

MUNDO, Transformando Nosso. Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. **ONU**. Nova York, 2015. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 09 jan. 2019.

NAIDU, M. M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. **LWT-Food Science and technology**, Amritsar, v. 44, n. 2, p. 451-456, 2011.

NAIDU, M. M; HEBBAR, U. H. Ervas de Secagem: Estudos de Casos. 2008. Disponível em: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:R9gokz62gDkJ:scholar.google.com/+thermosensitive+trigonella+foenum+graecum&hl=pt-BR&as_sdt=0,5. Acesso em 05 jul. 2019.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington: National Academic Press, 2011.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 226-247, 2009.

OLAIYA, C. O.; SOETAN, K. O. A review of the health benefits of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.): Nutritional, Biochemical and pharmaceutical perspectives. **Am. J. Soc. Issues Humanit.** [S.l.], p. 3-12, 2014.

PALAKSHA, K.J., et al. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**. Oxford, v. 24, p. 479-488, 2008.

PALTI, Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. **Developmental & Comparative Immunology**. Tarrytown, v. 35, n. 12, p. 1263-1272, 2011.

PASRICHA, V.; GUPTA, R. K. Nutraceutical potential of Methi (*Trigonella foenum graecum* L.) and Kasuri methi (*Trigonella corniculata* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Nova Deli, v. 3, n. 4, 2014.

PAUL, B. N. et al. Effect of dietary attractant on feed utilisation and growth of *Rohu Labeo rohita* (Ham.) fry. **Animal Nutrition and Feed Technology**. Nova Deli, 2004.

PEIXEBR. Anuário Peixe BR. São Paulo: **Associação Brasileira da Piscicultura**, 2019. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario2018/>. Acesso em: 09 jan. 2019.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. **Food/Nahrung**, v. 44, n. 1, p. 42-46, 2000.

POKORNÝ, J.; SCHMIDT, S. Natural antioxidant functionality during food processing. **Antioxidants in food**, p. 331-350, 2001.

POOLE, C. et al. The effects of a commercially available botanical supplement on strength, body composition, power output, and hormonal profiles in resistance-trained males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 34, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**. São Paulo, p. 755-760, 2006.

RANZANI-PAIVA, T. J. M. et al. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá, **Editora UEM**, p. 13-135, 2013.

RAJU J. et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. **Mol Cell Biochem**, v. 224, p. 45-51, 2001.

REDA, R. M. et al. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 4, p. 241-248, 2013.

REYES-BECERRIL, M. et al. Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. in fish: *In vitro* and *in vivo* studies. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 86, p. 420-428, 2019.

ROMANO, L. A., El sistema inmune inespecífico de los pexes, *in*: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. L. A. P.; TAKEMOTO, R. M. (org.) **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. Maringá, 2012, cap. 11.

ROOHI, Z. et al. The use of fenugreek seed meal in fish diets: Growth performance, haematological and biochemical parameters, survival and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 1209-1215, 2017.

ROSS D, MOLDEUS P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p. 151-70, 1991.

RUBY B. C, et al. The addition of fenugreek extract (*Trigonella foenum-graecum*) to glucose feeding increases muscle glycogen resynthesis after exercise. **Aminoacids** v. 28, p. 71-76, 2005.

SACCOL, E. M. H., LLESUY, S. F. L., PAVANATO, M. A. Antioxidantes na aquicultura, *in*: BALDISSEROTO B., et al. (org.). **Farmacologia aplicada à aquicultura**. Santa Maria: UFSM, 2017. cap. 15.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 821-826, 2008.

SAEED, M. K. et al. Nutritional value and antioxidant activity of Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) from two regions of Pakistan. **Pakistan Journal of Food Sciences**. Jamshoro, v. 23, n. 3, p. 144-147, 2013.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, M. R. Extratos vegetais como aditivos em rações para peixes. Belo Horizonte: **Revista Eletrônica Nutritime**, 2009. Disponível em: http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/077V6N1P789_800_JAN2009_.pdf. Acesso em: 08 jan. 2019.

SANG, H.M.; FOTEDAR, R.; FILER, K. Effects of dietary mannanoligosaccharide on the survival, growth, immunity and digestive enzyme activity of freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (1936). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 629-35, 2011.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**. Oxford: v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SAXENA, S. N. et al. Analysis of antioxidant activity, phenolic and flavanoids content of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) seed extracts. **Int J Seed Spices**, v. 1, n. 1, p. 38-43, 2011.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 16, n. 2, p. 177-201, 2018.

SCORVO FILHO, J. D. et al. **A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 39, p.112-118, 2010.

SEGNER, H. et al. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 85-105, 2012.

SHALABY S. M. M., Response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings diets supplemented with different levels of fenugreek seeds (Hulba). **Journal Agriculture Mansoura University**. Almançora, v. 29, n. 29, p. 2231-2242, 2004.

SHARMA, R. D. Effect of fenugreek seeds and leaves on blood glucose and serum insulin responses in human subjects. **Nutrition Research**, v. 6, n. 12, p. 1353-1364, 1986.

SHEPARD, K. L. Functions for fish mucus. **Fish Biology and Fisheries**. [S.l.], vol. 4 (4), p. 401-429, 1994.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of enology and viticulture**. Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SNEHLATA, H. S.; PAYAL, D. R. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.): an overview. **Int J Curr Pharm Rev Res**. Jaipur, v. 2, n. 4, p. 169-87, 2012.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, S.K. et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. **Fish Shellfish Immunology**, v. 10, p. 40-48, 2014.

SONAM K. S.; GULERIA S. synergistic antioxidant activity of natural products. **Ann Pharmacol Pharm**. v. 2, n. 16, p. 1086. 2017

SOWMYA, P.; RAJYALAKSHMI, P. Hypocholesterolemic effect of germinated fenugreek seeds in human subjects. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 359-365, 1999.

SRINIVASAN, K. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. **Food reviews international**, v. 22, n. 2, p. 203-224, 2006.

SUBHASHINI, N. et al. Anti-inflammatory and in vitro antioxidant property of *Trigonella foenum graecum* seeds. **Journal of Pharmacology and Toxicology**. Nova Iorque, v. 6, n. 4, p. 371-380, 2011.

SUBHASHINI, N.; THANGATHIRUPATHI, A.; LAVANYA, N. Antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* using various *in vitro* and *in vivo* models. **Int J pharm pharm Sci**. Bhopal, v. 3, n. 2, p. 96-102, 2011.

SUKUMARAN, V.; PARK, S. C.; GIRI, S. S. Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 57, p. 362-370, 2016.

SUR, P. et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. **Phytotherapy Research**. Londres, v. 15, n. 3, p. 257-259, 2001.

SYEED, F. et al. Effect of *Trigonella foenum graecum* seed as feed additive on growth, haematological responses and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio* fingerlings. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. Rohini, v. 7, n. 2, p. 2889-2894, 2018.

THOMAS, J. E. et al. Biochemical monitoring in fenugreek to develop functional food and medicinal plant variants. **New biotechnology**. Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 110-117, 2011.

UEMURA, T. et al. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR α activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 1, p. 17-23, 2010.

URBINATI, C. E.; ZANUZZO, S. F. BILLER-TAKAHASHI, D. J. Estresse e Sistema Imune em peixes, *in*: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, E. J. P.; URBINATI, E. C. (org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. cap. 5.

URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinari Medicina**. Ostrava, v. 56, p. 486–503, 2011.

VALLADÃO, G. M. R. **Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidade em peixes**. 2014. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & shellfish immunology**. Oxford, v. 56, p. 34-69, 2016.

VATS, V.; GROVER, J. K.; RATHI, S. S. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**. Talca, v. 79, n. 1, p. 95-100, 2002.

VAZIRZADEH, A., DEGHAN, F., KAZEMEINI, R. Changes in growth, blood immune parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. **Fish & shellfish immunology**, Oxford, v. 69, p. 164-172, 2017.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**. São Paulo, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

WANI, S. A.; KUMAR, P. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2018.

WELKER, A. F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 4, p. 384-404, 2013.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**. v. 51, p. 32-49, 1934

YILMAZ, S.; SEBAHATTIN, E.; CELIK, E. S. Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. **Energy (kJ/g)**, v. 500, n. 21.79, p. 21.66-21.63, 2010.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S.; ÇELIK, E. Ş. Effect of Dietary Spice Supplementations on Welfare Status of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 229-237, 2016.

ZAKI, M. A. et al. Effect some medicinal plants diets on mono sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), growth performance, feed utilization and physiological parameters. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 220-227, 2012.

ZEPPENFELD, C. C., LOPES, J. M., BALDISSEROTTO, B. Promotores de crescimento na aquicultura, in: BALDISSEROTTO B., et al. (org.). **Farmacologia aplicada à aquicultura**. Santa Maria: UFSM, 2017. cap. 12.

ZHU, X. et al. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. Amsterdam, v. 27, n. 9, p. 1979-1985, 2008.